

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Frieze

EINFLUSS VON GALECTIN-1 AUF DIE SYNZYTIUMBILDUNG,
PROLIFERATION UND DIE SIGNALWEG AUSWAHL IN
TROPHOBLASTTUMORZELLEN BEWO

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
ISABELLE FISCHER

Aus Genf

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch Priv. Doz. Dr. Matthias Korell
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Lektine.....	1
1.2	Galektine	2
1.3	Galektin-1	5
1.3.1	Struktur von Gal-1.....	5
1.3.2	Sekretion von Gal-1	6
1.3.3	Bindungsaffinität von Gal-1.....	6
1.3.4	Effekte auf das Zellwachstum durch Gal-1	7
1.3.5	Einfluss auf das Immunsystem durch Gal-1	7
1.3.5.1	Einfluss auf das T-Zell-System durch Gal-1	8
1.3.5.2	Therapeutische immunologische Wirkung von Gal-1	10
1.3.5.3	Einfluss auf die fetomaternale Immuntoleranz durch Gal-1	11
1.3.6	Effekte auf die Tumorprogression durch Gal-1	12
1.3.6.1	Einfluss auf die Proto-Onkogenmutation durch Gal-1.....	12
1.3.6.2	Einfluss auf die Zelladhäsion bei Tumorprogression durch Gal-1....	13
1.3.6.3	Einfluss auf die Angiogenese bei Tumorprogression durch Gal-1 ...	13
1.3.6.4	Einfluss auf die Immuntoleranz bei Tumorprogression durch Gal-1	14
1.4	Trophoblastzellen	14
1.4.1	Physiologie der Plazenta	14
1.4.2	Trophoblasttumorzellen BeWo.....	16
1.4.3	Hormonsynthese in der Plazenta.....	16
1.4.4	Galektin-1 und Trophoblastzellen	17
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	In vitro Kultur der BeWo Zellen	20
3.2	Zellzählung.....	20
3.3	Immunzytochemie	21
3.3.1	Anfertigen von Chamberslides für die Immunzytochemie.....	21
3.3.2	ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Peroxidase-Methode.....	21
3.3.3	Auswertung der Immunzytochemie.....	25
3.3.3.1	Auswertung der Ki67 und Leptin Färbung	25
3.3.3.2	Auswertung der β -Catenin Färbung.....	26
3.4	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	26
3.4.1	Anfertigen von Chamberslides für die Immunfluoreszenz.....	26
3.4.2	Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	27
3.4.2.1	Erste Simultanexpression: E-Cadherin und Zytokeratin	27
3.4.2.2	Zweite Simultanexpression: Anti- β -Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase.....	29
3.4.2.3	Syncytin Expression	31
3.4.3	Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.....	32
3.4.3.1	E-Cadherin - Zytokeratin Doppelexpression, Syncytin Expression..	32
3.4.3.2	Anti- β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Anti-P450-Aromatase Doppelexpression	32
3.5	PCR.....	32
3.5.1	Zellkultivierung für die RNA Isolation	32
3.5.2	RNA-Isolation.....	33
3.5.3	Reverse Transkription.....	35
3.5.4	Durchführung der PCR	36
3.5.4.1	Real-time PCR.....	36

3.5.4.2	Auswertung der Real-Time-PCR	39
3.6	RayBio®Phosphorylation Antibody Array I	40
3.6.1	Zellkultivierung für den RTK Kit	40
3.6.2	Durchführung des RayBio®Phosphorylation Antibody Array I	41
3.6.2.1	Erstellung des Lysats	41
3.6.2.2	Durchführung des Bradford Tests	42
3.6.2.3	Phosphorylierungsassay	43
3.6.3	Interpretation der Ergebnisse	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Immunzytochemie	45
4.1.1	Positiv- und Negativ-Kontrollen	45
4.1.2	Ki67 Kernfärbung	46
4.1.3	Leptin Zytosolfärbung	48
4.1.4	β -Catenin Membranfärbung	49
4.2	Immunfluoreszenz	50
4.2.1	E-Cadherin-Zytokeratin Doppelexpression	50
4.2.2	Syncytin Expression	52
4.2.3	Humane Zytochrom P450-Aromatase	54
4.3	PCR-Ergebnisse	55
4.3.1	Ki67 und E-Cadherin mRNA Expression	55
4.4	Rezeptor-Tyrosinkinase Ergebnisse	56
4.4.1	Proteinassay nach Bradford Ergebnisse	56
4.4.2	Signalintensitätsergebnisse	57
5	Diskussion	59
5.1	Eigenschaften von Gal-1	59
5.2	Gal-1 inhibiert die Proliferation von BeWo Zellen	60
5.3	Gal-1 inhibiert die Hormonsynthese in BeWo Zellen	60
5.4	Gal-1 fördert die Synzytium Bildung in BeWo Zellen	60
5.5	Gal-1 beeinflusst Rezeptor-Tyrosinkinasen in BeWo Zellen	64
5.6	Mögliche zukünftige klinische Anwendung von Gal-1	66
6	Zusammenfassung	68
7	Bezugsquellenverzeichnis	70
8	Literaturverzeichnis	74
9	Danksagung	85
10	Widmung	85
11	Lebenslauf	86

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Tabelle der verschiedenen tierischen Lektin Familien (Gabius 2001).	2
Abb. 2:	Die verschiedenen Galektin-Typen beruhen auf ihrer CRD: Proto-, Chimera- und Tandemtyp.	3
Abb. 3:	Tabelle der humanen Galektine (Gabius, Siebert et al. 2004; Thijssen, Hulsmans et al. 2008).	4
Abb. 4:	Kristallographische Darstellung von Gal-1 (Lopez-Lucendo, Solis et al. 2004).	6
Abb. 5:	ST = Synzytiotrophoblast, VZT = villöser Zytotrophoblast, ZS = Zellsäule, DZ = Deziduazelle (Modifiziert nach (Malassine and Cronier 2002)).	15

Abb. 6: Noll S, Schaub-Kuhnen S: Praxis der Immunhistochemie. München, Jena, Urban & Fischer, 2000, pp 147.....	22
Abb. 7: Schema der ABC Methode.....	23
Abb. 8: Tabelle der verwendeten Antikörper, Immunzytochemie.	24
Abb. 9: Tabelle der verwendeten Antikörper, erste Simultanexpression, E-Cadherin und Zytokeratin.	27
Abb. 10: Schema der ersten Simultanexpression, E-cadherin und Zytokeratin.....	28
Abb. 11: Tabelle der verwendeten Antikörper, zweite Simultanexpression, Anti- β Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase.	29
Abb. 12: Schema der zweiten Simultanexpression, Anti- β Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase.	30
Abb. 13: Tabelle der verwendeten Antikörper, Syncytin-Expression.....	31
Abb. 14: Schema der RNA-Isolation.....	34
Abb. 15: Schema der Umschreibung von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase.	35
Abb. 16: FRET-TaqMan Sonden Prinzip, Department of Biology, Davidson College, Davidson, 2003.	37
Abb. 17: Mastermix Berechnungstabelle.	38
Abb. 18: 96well Platte: Ko1 = Kontrolle1, Ko2 = Kontrolle2, G1 = mit Gal-1 stimulierte Zellen1, G2 = mit Gal-1 stimulierte Zellen2, GAPDH = GAPDH Primer, Ecad = E-Cadherin Primer, Ki67 = Ki67 Primer.....	39
Abb. 19: Schema der PCR-Zyklen.....	39
Abb. 20: RayBio® Phosphorylation Antibody Array I, User Manual, 2004 RayBiotech, Inc.....	41
Abb. 21: Tabelle der 71 RTKs, Phosphorylation Antibody Array.....	44
Abb. 22: A: Leptin Positiv-Kontrolle an Placenta-Gewebe, B: E-Cadherin Positiv-Kontrolle an MammaCa-Gewebe, C: Beta-Catenin Positiv-Kontrolle an MammaCa-Gewebe, D: Ki67 Positiv-Kontrolle an MammaCa-Gewebe ($\times 20$).....	45
Abb. 23: A: Mouse Negativ-Kontrolle an BeWo Zellen, B: Sheep Negativ-Kontrolle an BeWo Zellen ($\times 40$).....	46
Abb. 24: Ki67 Expression in BeWo Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro: Abnahme der Ki67 Kernfärbung mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	47
Abb. 25: A: Ki67 Expression in BeWo Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro, B: Ki67 Expression in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro, C: Ki67 Expression in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro, D: Expression von Ki67 in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro ($\times 20$).....	47
Abb. 26: Leptin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro: Zunahme der Zytosolfärbung mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	48
Abb. 27: A: Leptin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro, B: Leptin Expression in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1, 48 h Kultivierung in-vitro ($\times 20$).	49
Abb. 28: β -Catenin Expression in BeWo Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro: Abnahme der Membranfärbung mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM...50	50
Abb. 29: β -Catenin Expression in BeWo-Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro (A), β -Catenin Expression in BeWo-Zellen nach Stimulierung mit 60 $\mu\text{g/ml}$ rek. Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro (B) ($\times 20$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	50

Abb. 30: E-Cadherin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro. Abnahme der Expression in den mit Gal-1 und Forskolin stimulierten Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	51
Abb. 31: A: E-Cadherin an unstim. BeWo Zellen (Kontrolle), B: E-Cadherin an BeWo Zellen mit 60 μ g/ml plac. Gal-1 stim., C: E-Cadherin an BeWo Zellen mit 60 μ g/ml rek. Gal-1 stim., D: E-Cadherin an BeWo Zellen mit forskolin stim., 48 h in-vitro.($\times 20$).	52
Abb. 32: Syncytin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro. Abnahme der Expression in den mit Gal-1 und Forskolin stimulierten Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	53
Abb. 33: A: Syncytin an unstim. BeWo Zellen, B: Syncytin an BeWo Zellen mit 60 μ g/ml Forskolin stim., C: Syncytin an BeWo Zellen mit 60 μ g/ml Forskolin stim., 48 h in-vitro ($\times 20$).	53
Abb. 34: Humane Zytochrom P450-Aromatase Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro: Abnahme der exprimierenden Zellzahl mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	54
Abb. 35: Humane Zytochrom P450-Aromatase an BeWo Zellen (A), 48 h Kultivierung in-vitro, Expression von Humaner Zytochrom P450-Aromatase in BeWo Zellen stimuliert mit 60 μ g/ml Gal-1, 48 h Kultivierung in-vitro (B) ($\times 20$).	55
Abb. 36: Ki67 mRNA Expression in BeWo Zellen, 1 h Kultivierung in-vitro. . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	55
Abb. 37: E-Cad mRNA Expression in BeWo Zellen, 1 h Kultivierung in-vitro. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	56
Abb. 38: Chemilumineszenz Signale der RTKs auf den Membranen in BeWo Zellen (A) verglichen mit 60 μ g/ml Gal-1 stimulierten Zellen (B): JAK2 (G8, H8), RET(G10, H10), VEGFR3 (G13, H13), 24 h Kultivierung in-vitro.	57
Abb. 39: Prozentuale Signalintensitätsänderung von RET, JAK2 and VEGFR3 in mit 60 μ g/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (= 100%), 24 h in vitro. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.	58

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (<i>aqua destillata</i>)
B-Lymphozyt	<i>B</i> = <i>Bone Marrow</i> (Knochenmark)-Lymphozyt
BRDU	5-bromo-2'-deoxy-uridine
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
CDNA	Komplementäre DNA
CRD	Kohlenhydrat erkennende Domäne
CT	<i>Threshold Cycle</i> (Schwellenwertzyklus)
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol

Abkürzungsverzeichnis

DHEA-S	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELISA	<i>Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay</i> (Enzym-gekoppelter Immun-Adsorptionstest)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EVT	Extravillöser Trophoblast
FAM	Fluorescein amidite
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
Gal	Galektin
GDP	Guanosindiphosphat
GFL	Gliale Familien-Liganden
Glc	Glukose
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
GvH	<i>Graft versus Host</i> (Transplantat-Wirt)
β -hCG	Beta-Choriongonadotropin
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HERV	Humaner endogener Retrovirus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
IRS	Immunoreaktiver Score
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LacNAc	N-Acetyllactosamin
Lck	Leukozyten-spezifische Proteintyrosinkinase
Leu	Leucin
Lys	Lysin
LH	Luteinisierendes Hormon
MAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MEK	MAP/ERK-Kinase
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ML	Milliliter
Min.	Minute
mM	Millimol pro Liter
μ M	Micromol pro Liter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (messenger-Ribonukleinsäure)

MW	Mittelwert
NK	Natürliche Killerzellen
NTP	Nukleosidtriphosphate
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH-Wert	von lat. <i>potentia</i> , Kraft und <i>hydrogenium</i> Wasserstoff
Phe133	Phenin
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
Plac.	Plazentar
PTK	Proteintyrosinkinasen
PTP	Proteintyrosinphosphatasen
Raf	<i>Rapidly growing Fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i> (Ratten Fibrosarkom)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (Ratten Sarkom)
Rek.	Rekombinant
RET	<i>Rearranged during transfection</i> (Neugeordnet während Transfektion)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
Scc	<i>Side chain cleavage enzyme</i> (Seitenketten Teilungs Enzym)
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
Ser	Serin
SI	<i>Staining and intensity</i> (Färbung und Intensität)
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> (Signalgeber und Transkriptionsaktivatoren)
Std	Stunde
Stim.	Stimuliert
µm	Mikrometer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TF	Transkriptionsfaktoren
TF-Antigen	Thomsen-Friedenreich Antigen
Th	T-Helfer-Zelle
T-Lymphozyten	Thymus-abhängige Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	<i>T = Tumor, N = Nodes</i> (Lymphknoten), <i>M = Metastasen</i>
TReg Zelle	T-regulative Zelle
Val	Valin
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Endothel Wachstumsfaktor)
ZAP70	Zeta-Ketten-assozierte Proteinkinase 70

1 Einleitung

1994 führte Barondes den Begriff „Galektin“ ein (*Barondes, Castronovo et al. 1994*), um eine klare Nomenklatur für dieses zunehmend ins wissenschaftliche Interesse geratene Protein zu schaffen, welches bis dahin unter verschiedenen Namen in diversen Arbeiten publiziert wurde. Die zu erfüllenden Kriterien, um in die Klasse der Galektine zu gehören, waren eine Affinität zu β -Galaktosiden, Glykoside mit Galaktose als Kohlenhydratkomponente, und signifikante Ähnlichkeiten in der Kohlenhydratbindungssequenz, deren Aminosäureketten ein Jahr zuvor in X-Ray Kristallographie spezifiziert worden waren (*Lobsanov, Gitt et al. 1993; Barondes, Castronovo et al. 1994*). Es wurden damals vier Galektine unterschieden, deren Nummerierung sich nach dem Entdeckungsdatum richtete. In den kommenden Jahren erfolgte die Charakterisierung von weiteren Galektinen, was Barondes und Cooper zu einem gewagten Titel ihrer im Jahre 1999 veröffentlichten Publikation veranlasste „Gott muss Galektine lieben: er hat so viele von ihnen gemacht.“, in Anlehnung an Abraham Lincolns Zitat „Gott muss gewöhnliche Menschen lieben: er hat so viele von ihnen gemacht.“ (*Cooper and Barondes 1999*).

1.1 Lektine

Lektine sind Proteine, die Mono- und Oligosaccharide reversibel und hoch spezifisch binden. Sie sind di- oder polyvalent, d.h. sie besitzen mindestens zwei Kohlenhydratbindungsstellen. Sie sind somit in der Lage, Zellen zu agglutinieren und Glykokonjugate zu präzipitieren (*Lis and Sharon 1998*). Da sie ursprünglich aus Pflanzenextrakten isoliert und zur Agglutination von Erythrozyten eingesetzt wurden, sprach man zunächst von Phytohämagglutininen. Später stellte sich heraus, dass sie auch aus tierischen Zellen und Geweben isoliert werden können, und dass sie nicht nur Erythrozyten binden. Ihr Name leitet sich von dieser Eigenschaft ab: „lego“, daher „auswählen“ (*Boyd and Shapleigh 1954*).

Lektine werden in vielen Organismen exprimiert, unter anderem in Viren, Bakterien, Pflanzen und Tieren. Sie bilden eine heterogene Gruppe von oligomeren Proteinen, die in ihrer Größe, Struktur und molekularen Anordnung variieren. Sie können in fünf Gruppen eingeteilt werden, gemäß dem Monosaccharid, für das sie die höchste Affinität besitzen: Mannose, Galaktose/N-Acetylgalaktosamin, N-Acetylglukosamin, Fucose und N-Acetylneuramininsäure (*Lis and Sharon 1998*).

Die tierischen Lektine können in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden: C-Typ, I-Typ, S-Typ (Galektine), P-Typ und Pentraxine (Gabius 2001) (siehe Abb. 1).

Familie	Strukturmotiv	Zuckerligand
<i>CTyp</i>	<i>konservierte CRD (Ca²⁺ Ionen)</i>	<i>variabel (u. a. Mannose, Galaktose, Fucose, Heparin-Tetrasaccharid)</i>
<i>I-Typ</i>	<i>Immunglobulin-ähnliche CRD</i>	<i>variabel (Man6GlcNAc2, HNK-1 Epitop, Hyaluronsäure, α2,3/α2,6-Sialyllaktose)</i>
<i>Galektine (S-Typ)</i>	<i>konservierte CRD</i>	<i>Galβ1,3(4)GlcNAc Basisstrukturen mit Spezies und Galektintyp-abhängigen Affinitätsunterschieden für die Verlängerung, Affinität auch zu Poly-(N-Acetyl-Lactosamin)-Ketten</i>
<i>Pentraxine</i>	<i>Pentamerische Anordnung der Untereinheiten</i>	<i>4,6-Ringazetale von β-Galaktose, Galaktose, sulfatierte und phosphorylierte Monosaccharide</i>
<i>P-Typ</i>	<i>konservierte CRD</i>	<i>Mannose-6-Phosphat enthaltende Glykoproteine</i>

Abb. 1: Tabelle der verschiedenen tierischen Lektin Familien (Gabius 2001).

1.2 Galektine

Galektine sind eine Proteinfamilie der β -Galaktosid-bindenden Lektine. Die bisher beschriebenen Galektine besitzen ein oder zwei Kohlenhydrat erkennende Domänen (CRD). Die Galektin-CRD ist nicht mit anderen Proteindomänen assoziiert. Die Mono-CRDs können als Monomer, Dimer oder Oligomer vorliegen.

1993 schlugen Hirabayashi und Kasai vor, Galektine in Proto-, Chimera- und Tandemtypen einzuteilen, beruhend auf ihrer Kohlenhydrat erkennenden Domäne: Prototypen besitzen demnach zwei gleiche CRDs, der Chimeratyp eine CRD und einen weiteren Domäntypen und der Tandemtyp zwei unterschiedliche CRDs. Letztere sind durch eine Prolin-Glyzinreiche Bindungsstelle getrennt (Hirabayashi and Kasai 1993) (siehe Abb. 2). Die bisher beschriebenen Galektin-CRDs haben ähnliche Affinitäten zu Lactose oder N-Acetyl-Lactosamin. Sie besitzen etwa 135 hochkonservierte Aminosäuren, die verantwortlich sind für die Bindung zu β -Galaktosiden. Geringe Unterschiede in der Kohlenhydrat erkennenden Bindung lassen vermuten, dass jedes Galektin mit unterschiedlichen Glykokonjugatrezeptoren interagieren kann. Daraus ergibt sich eine spezifische Wirkung der einzelnen Proteine (Hughes 1999).

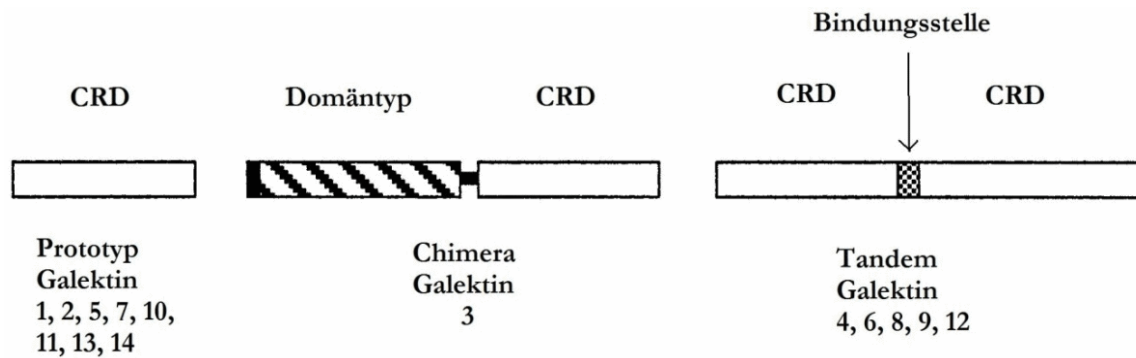


Abb. 2: Die verschiedenen Galektin-Typen beruhen auf ihrer CRD: Proto-, Chimera- und Tandemtyp.

Die Multivalenz bestimmter Galektine und die daraus resultierende Quervernetzung rufen verschiedene biologische Wirkungen hervor. Zwei Multivalenz-Typen wurden in dimerischen Galektinen beschrieben: Typ I bildet einen Komplex zwischen einem divalenten Kohlenhydratmolekül und einem divalenten Galektinmolekül, Typ II bildet einen Komplex zwischen einem Kohlenhydratmolekül und einem Galektinmolekül, bei dem einer der beiden Moleküle eine Valenz >2 besitzt. Die Fähigkeit bestimmter Galektine, Typ I oder Typ II Komplexe einzugehen, kann verschiedene biologische Aktivitäten hervorrufen und sogar gegensätzliche Wirkungen auslösen (Sacchetti, Baum et al. 2001)(Cho et al., 1997).

Galektine kommen hauptsächlich in Säugetieren vor, wurden aber auch in Wirbeltieren, wie z.B. im Frosch (Ahmed, Pohl et al. 1996) und in Invertebraten, wie z.B. im Schwamm (Wagner-Hulsmann, Bachinski et al. 1996), nachgewiesen. Galektin-1 (Gal-1) wurde als erstes Mitglied dieser Familie zwanzig Jahre zuvor aus dem elektrischen Organ des Zitteraals isoliert (Teichberg, Silman et al. 1975).

Einige Galektine haben individuelle Namen, abhängig von ihrer Funktion, ihrer Lokalisation oder ihrer biochemischen Eigenschaften: Gal-1 (L-14, Bovine heart lectin oder Galaptin, s. 2.3), Gal-3 (Mac-2, L-29, CBP-35 oder ϵ -BP für 'IgE-bindendes Protein'), Gal-9 (Ecalectin), Gal-10 (Charcot-Leyden crystal eosinophiles Protein), Gal-11 (GRIFIN für Galectin-related interfiber protein) und Gal-13 (PP-13) (Rabinovich 1999).

Gal-1 -4, -7, -9 und -12 kommen im Menschen, in der Ratte, in der Maus und in weiteren Säugetieren vor. Gal-5 konnte nur in Ratten, Gal-6 nur in Mäusen, Gal-15 nur in Ziegen und Schafen und Gal-10 und -13 nur im Menschen identifiziert werden (Leffler, Carlsson et al. 2004; Lewis, Farmer et al. 2007) (siehe Abb. 3).

Humanes Galektin	Strukturmerkmale
Galektin-1 (Galaptin, L-14)	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (14–15 kDa): Proto-Typ
Galektin-2	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit: Proto-Typ
Galektin-3 (CBP35, Mac-2 Antigen, L-29, IgE-bindendes Protein, L-34)	Monomer mit einer CRD (27–36 kDa): Chimären-Typ
Galektin-4	zwei homologe CRDs, verbunden durch ein Linkerpeptid (36 kDa): Tandem-repeat-Typ
Galektin-7	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (15 kDa): Proto-Typ
Galektin-8	Tandem-repeat-Anordnung von zwei CRDs mit einem Linkerpeptid, (34 kDa)
Galektin-9	Tandem-repeat-Anordnung von zwei CRDs mit einem Linkerpeptid, (36 kDa)
Charcot-Leyden Kristallprotein (Galektin-10)	eine CRD-ähnliche Struktur mit Spezifität für D-Man (16,5 kDa): Prototyp
Galektin-12	Tandem-repeat-Anordnung von zwei CRDs mit einem Linkerpeptid, (35,3 kDa)
Galektin-13	Homodimer; eine CRD pro Untereinheit (16,1 kDa): Prototyp
Galektin-14	eine CRD, die den Proto-Typ-Galektinen ähnelt (18,2 kDa): Prototyp

Abb. 3: Tabelle der humanen Galektine (Gabius, Siebert et al. 2004; Thijssen, Hulsmans et al. 2008).

Galektine besitzen typische Merkmale von zytoplasmatischen Proteinen: sie werden an zytosolischen Ribosomen synthetisiert, haben keine Signalsequenz, dafür aber acetylierte N-Termini (Hsu and Liu 2004). Trotz vorliegender Glykosilierungsmotive sind Galektine nicht glykosiliert, was dafür spricht, dass sie nicht das Endoplasmatische Retikulum- (ER) und Golginetzwerk passieren. Ein Vorteil dieses unkonventionellen Proteinexports ist, dass die Galektine dadurch vermeiden, über den klassischen Weg potentielle Glykoproteinbindungen einzugehen (Hughes 1999). In den letzten Jahren sind zahlreiche Funktionen von Galektinen erforscht worden. Einige sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

Galektine spielen eine Rolle in der Apoptose: Gal-3 hat eine pro-apoptotische, Gal-1 eine anti-apoptotische Wirkung (Yang, Hsu et al. 1996), Gal-12 bewirkt einen Zellzyklus-Arrest und Apoptose in Adipozyten (Yang, Hsu et al. 2001), Gal-9 induziert hingegen eine Apoptose in murinen Thymozyten (Wada and Kanwar 1997).

Ebenso wurde ein Zusammenhang in der Allergologie beschrieben: in einer Publikation konnte gezeigt werden, dass Gal-14 beim bronchialen Asthma freigesetzt wird (Dunphy, Barcham et al. 2002). Gal-9 agiert als eosinophiler Chemolockstoff (Matsumoto, Matsumoto et al. 1998) und Gal-3 hat eine Funktion als eosinophiles Adhäsionsmolekül (Rao, Wang et al. 2007).

Ein weiteres Forschungsgebiet betrifft die Tumorphathologie: es wurde eine erhöhte Konzentration von Gal-3 bei Fernmetastasierung beschrieben (*Iurisci, Tinari et al. 2000*). Gal-7 wurde eine Funktion als früher Transkriptionsfaktor für das Tumorsuppresorgen p53 zugeschrieben (*Bernerd, Sarasin et al. 1999*).

Galektin spielt zudem eine Rolle in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Gal-3 fördert beispielsweise die Neutrophilenadhäsion zu Laminin (*Kuwabara and Liu 1996*), Gal-8 hingegen inhibiert die Zelladhäsion, indem es Komplexe mit Mitgliedern der Integrin Familie bildet (*Yoshii, Fukumori et al. 2002*).

1.3 Galektin-1

Gal-1 wurde als erstes Mitglied der β -Galaktosid-bindenden Proteine entdeckt (*Barondes, Castronovo et al. 1994*). Es hat ein Molekulargewicht von 29,0 kDa (Monomer 14,5 kDa).

1.3.1 Struktur von Gal-1

Gal-1 wird zu der Gruppe der Prototypen der Galektine (s. Abb.1) nach Hirabayashi gezählt (*Hirabayashi and Kasai 1993*). Es wird durch das LSGALS1-Gen kodiert, das sich auf Chromosom 22q12 befindet. Zwei identische Monomere bilden ein nicht kovalent verknüpftes Homodimer mit zwei Kohlenhydrat erkennenden Domänen (CRD) für die Bindung von Gal β 1-4GlcNAc Sequenzen. Es hat eine β -„Sandwich“ Struktur, bestehend aus 2 antiparallelen β -Faltblattstrukturen von fünf (F1-F5) und sechs (S1-S2a/b) Strängen. Die N- und C-Termini der beiden Monomere befinden sich an der Kopplungsstelle.

Die Integrität des Dimers wird durch Interaktionen an der Kopplungsstelle zwischen den Monomeren und dem hydrophoben Kern erreicht. Es gibt vier Hydrogenbindungen zwischen Val5 und Ser7 auf beiden S1 Strängen der Vorderfläche, und fünf Hydrogenbindungen zwischen Lys129, Phe133 und Val131 auf den F1 Strängen der gegenüberliegenden Seite. Die Seitenketten der nicht-polaren Reste von S1 (Leu4, Ala6 und Leu9) und F1 (Ile128, Val131, Phe133) ragen in das Innere des Moleküls rein: der so entstandene hydrophobe Kern ist für die Stabilität der Dimerstruktur verantwortlich (*Lopez-Lucendo, Solis et al. 2004*) (siehe Abb. 4).

In niedrigen Konzentrationen kann das Dimermolekül spontan zu zwei Monomeren dissoziieren (*Cho and Cummings 1995*).

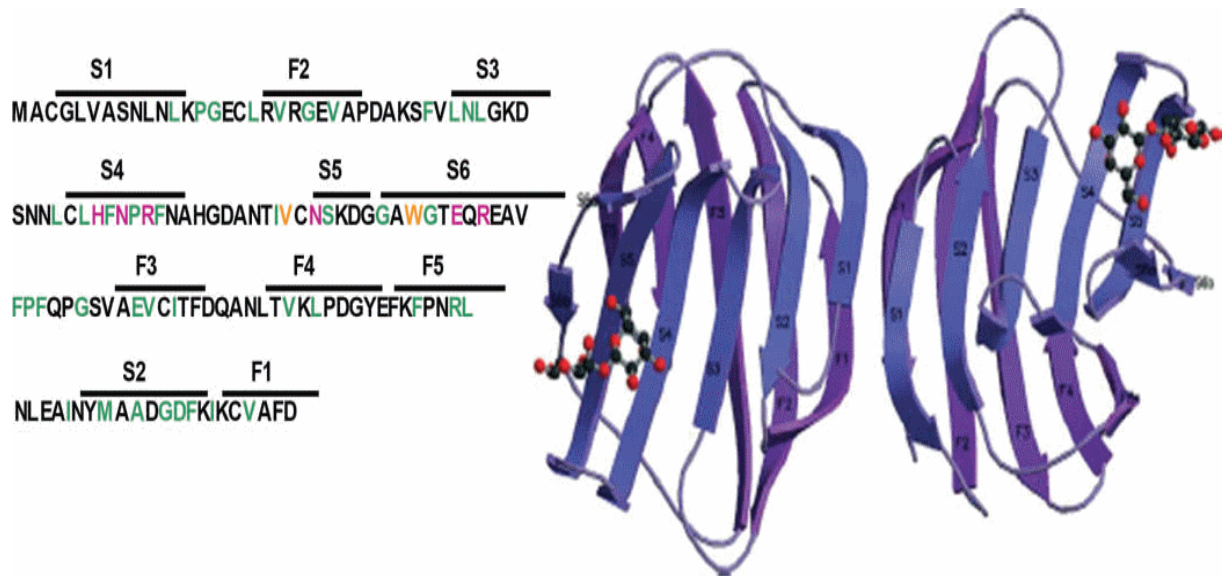


Abb. 4: Kristallographische Darstellung von Gal-1 (Lopez-Lucendo, Solis et al. 2004).

1.3.2 Sekretion von Gal-1

Wie bereits unter 1.2 beschrieben, wird Gal-1 an freien zytosolischen Ribosomen synthetisiert (Wilson, Firth et al. 1989). Das Protein besitzt acetylierte N-Termini, jedoch keine Signalsequenz (Couraud, Casentini-Borocz et al. 1989). Es weist nicht die typischen Zeichen einer klassischen Sezernierung auf: es hat einen blockierten N-Terminus, ist nicht glykosiliert, obwohl es Glykosilierungsmotive enthält, und besitzt keine Disulfidbrücken. Es wird daher unkonventionell sezerniert und umgeht somit den Transport über das ER- und Golginetzwerk. Somit wird vermieden, dass es vorzeitig von Glykolipiden und -proteinen gebunden wird (Cooper and Barondes 1990; Hughes 1999; Hsu and Liu 2004). Ein Hinweis hierfür ist die Resistenz gegenüber Brefeldin A, das die ER- und Golginetzwerkabhängige Sekretion inhibiert (Misumi, Miki et al. 1986; Lippincott-Schwartz, Yuan et al. 1989).

Die β -Galaktosid-spezifische CRD ist verantwortlich für die Zielsteuerung des Proteins zur Außenseite. Hierfür soll die Bindung an Glykokonjugate, die als Cargorezeptoren fungieren, essentiell sein (Nickel 2005). In den letzten Jahren wurde außerdem diskutiert, ob Gal-1 in einem exosomassoziierten Exportmechanismus in den Extrazellulärraum gelangt (Nickel 2003). Dies konnte in einer neuen Studie widerlegt werden (Seelenmeyer, Stegmayer et al. 2008).

1.3.3 Bindungsaffinität von Gal-1

Gal-1 bindet bevorzugt Disaccharid-N-Acetylglucosamin-Sequenzen (Gal- β 1-3/4 GlcNAc oder LacNAc/II). Die Bindungsaffinität ist erhöht, wenn diese in

multiantennären repetitiven Seitenketten (Schwarz, Ahmed et al. 1998; Ahmad, Gabius et al. 2004) oder als terminale LacNAc-Sequenzen vorliegen (Ahmad et al. 2002), ist jedoch nicht gesteigert, wenn LacNAc als Poly-N-Lactosamin vorliegt, also als repetitive Einheit in einem Seitenstrang (Ahmad, Gabius et al. 2004). Die Affinität der Glykane ist außerdem erhöht, wenn diese zelloberflächengebunden sind oder sich an der Extrazellulärmatrix befinden (He and Baum 2004), und erniedrigt, wenn diese in freier Lösung vorliegen (Leppanen, Stowell et al. 2005).

Eine Sedimentanalyse und eine Spektrometriemessung konnten zeigen, dass Gal-1 in Lösung bevorzugt als Dimer vorliegt (Morris, Ahmad et al. 2004). Die daraus resultierende Bivalenz erleichtert eine glykanvermittelte Zelloberflächenrezeptorbindung, die wichtig ist, um Signalwege zu beeinflussen (Perillo, Pace et al. 1995; Walzel, Blach et al. 2000). Weiterhin konnten Zirkulardichroismusmessungen und Energieprofile von Bindungs- und Dimerisationsprozessen zeigen, dass die Bindung von spezifischen Disacchariden an Gal-1 dessen Struktur nicht verändert, aber zu Energiealterationen führt, die dessen thermale Stabilität erhöhen (Di Lella, Marti et al.).

1.3.4 Effekte auf das Zellwachstum durch Gal-1

Gal-1 hat sowohl inhibitorische als auch aktivierende Effekte auf das Zellwachstum, abhängig von Zelltyp und Aktivierungsstatus der Zelle. So hat Gal-1 beispielsweise einen positiven Effekt auf das Zellwachstum in Lymphknotenzellen (Symons, Cooper et al. 2000) Mammagefäßzellen (Moiseeva, Javed et al. 2000), Kupffer-Sternzellen der Leber (Maeda, Kawada et al. 2003) und in neuronalen Stammzellen (Sakaguchi, Shingo et al. 2006), und einen negativen Effekt auf das Zellwachstum in Neuroblastomzellen (Kopitz, von Reitzenstein et al. 2001), stromalen Knochenmarkszellen (Andersen, Jensen et al. 2003) und Chondrozyten (Marsich, Mozetic et al. 2008).

1.3.5 Einfluss auf das Immunsystem durch Gal-1

Viele Studien haben in den letzten Jahren deutlich gemacht, dass Gal-1 das Immunsystem auf verschiedenen Ebenen beeinflusst. So wurde Gal-1 in zahlreichen immunprivilegierten Geweben nachgewiesen, z.B. im Gehirn (Joubert, Kuchler et al. 1989), in Hodengewebe (Dettin, Rubinstein et al. 2003) und in der Plazenta (Poirier, Timmons et al. 1992). Zudem wird Gal-1 in primären und sekundären lymphatischen Organen und in zirkulierenden Zellen exprimiert: in stromalen Thymuszellen (Baum,

Pang et al. 1995), in inflammatorischen Makrophagen (*Rabinovich, Castagna et al. 1996; Zuniga, Gruppi et al. 2001*), in aktivierten B- (*bone marrow*, engl. für Knochenmark) (*Zuniga, Rabinovich et al. 2001*) und T-Lymphozyten (Thymus-abhängige Lymphozyten) (*Blaser, Kaufmann et al. 1998; Rabinovich, Ramhorst et al. 2002*). Die Effekte von Gal-1 auf die Immunzellen beruhen weitestgehend auf der Bindung von Glykoproteinen, die sich auf der Zelloberfläche befinden (*Galvan, Tsuboi et al. 2000; Amano, Galvan et al. 2003*). Zusätzlich spielen intrinsische Faktoren, wie Dimer- oder Monomer-Konfiguration des Proteins, und extrinsische Faktoren, wie Zelltyp oder Aktivierungsstatus eine Rolle. Gal-1 ruft somit unterschiedliche Immunreaktionen in verschiedenen Zellen hervor, wie z.B. pro- oder anti-inflammatorische Effekte, Induktion von Zellüberleben oder programmiertem Zelltod (*Rabinovich and Ilarregui 2009*).

1.3.5.1 Einfluss auf das T-Zell-System durch Gal-1

Der Einfluss von Gal-1 auf das T-Zell-System wurde in den letzten Jahren genauer untersucht.

Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass Gal-1 in seiner Dimer-Konfiguration die Apoptose aktivierter T-Zellen humaner T- und Leukämiezelllinien fördert (*Perillo, Pace et al. 1995*). Die proapoptotische Aktivität von Gal-1 wurde auch in frisch isolierten T-Zellen untersucht. Gal-1 kann die ruhenden Zellen für die Apoptose sensibilisieren und den Fas-(CD95)-vermittelten Zelltod der aktivierten T-Zellen potenzieren, welcher durch einen anti-Fas-neutralisierenden Antikörper inhibiert werden kann. Weiterhin scheinen p56-Leukozyten-spezifische Proteintyrosinkinase (Lck) und Zeta-Ketten-assoziierte Proteinkinase 70 (ZAP70) eine Rolle zu spielen (*Kovacs-Solyom, Blasko et al.*). Zudem ist Caspase-8 in die apoptotische Kaskade der frisch isolierten T-Zellen involviert (*Matarrese, Tinari et al. 2005*). In einer anderen Studie wurde hingegen gezeigt, dass Gal-1 die Apoptose in einer Lymphoblastoidtumorzelllinie über einen Caspase-unabhängigen Weg induziert (*Hahn, Pang et al. 2004*). Weiterhin wurde demonstriert, dass Gal-1 die Apoptose-Induzierung in Jurkat T-Lymphozyten über den mitochondrialen Signalweg fördert (*Lange, Brandt et al. 2009*). Zudem scheinen sich auch Galektine untereinander zu beeinflussen: so führt die intrazelluläre Gal-3 Expression in T-Zellen zu einer Resistenz gegenüber Gal-1-induziertem programmierten Zelltod (*Rabinovich and Ilarregui 2009*).

Viele Zelloberflächenglykoproteine von T-Zellen enthalten Lactosaminsaccharide, aber nur eine bestimmte Anzahl bindet Gal-1. Die Bindung von Gal-1 an die T-Zellen induziert die Umlagerung von spezifischen Glykoproteinen in Mikrodomänen der Zelloberfläche. Die Bindung zu den Glykoproteinen CD45, CD43 und CD7 wurde in den letzten Jahren mehrmals beschrieben (*Pace, Lee et al. 1999; Fulcher, Chang et al. 2009*).

Die CD45-Bindung kann ein pro-apoptotisches Signal in humanen T-Zellen induzieren (*Klaus, Sidorenko et al. 1996; Lesage, Steff et al. 1997*). In einer anderen Studie wurde CD45 hingegen als negativer Regulator der T-Zell-Apoptose beschrieben (*Byth, Conroy et al. 1996*). Die Rolle von CD45 in Gal-1-vermittelter T-Zell-Apoptose wird kontrovers diskutiert: Pace et al. zufolge wird die Apoptose dadurch gefördert, in anderen Studien wurde hingegen gezeigt, dass Gal-1 die Apoptose in CD45-defizienten T-Zellen fördert (*Fajka-Boja, Szemes et al. 2002*). Nguyen et al. nach, kann Gal-1 den Zelltod positiv und negativ beeinflussen: der Glykosilierungsstatus von Gal-1 spielt demnach die entscheidende Rolle (*Nguyen, Evans et al. 2001*).

Seit 1996 ist bekannt, dass eine CD43-Bindung den Zelltod in Jurkatzellen fördert (*Brown, Shuford et al. 1996*). Lange Zeit war der genaue Einfluss der Gal-1-Bindung von CD43-Rezeptoren auf T-Zellen nicht bekannt. In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass der CD43-Verlust in murinen Thymozyten und in humanen T-Lymphoblastoidzellen den Gal-1-induzierten Tod hemmt. Dies weist darauf hin, dass CD43 für die maximale T-Zell-Suszeptibilität zu Gal-1 von Bedeutung ist (*Hernandez, Nguyen et al. 2006*).

CD7 wird von humanen unreifen T-Zellen exprimiert und ist in aktivierten T-Zellen hochreguliert. Beide Zellpopulationen werden durch Gal-1 beeinflusst (*Perillo, Uittenbogaart et al. 1997*). Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit anti-CD7 mAK behandelt wurden, zeigten eine Abnahme der peripheren T-Zellen um 50% (*Kirkham, Thien et al. 1992*). Wie bereits oben beschrieben, bindet Gal-1 bevorzugt Gal- β 1-4GlcNAc Sequenzen auf N- oder O-gebundenen Glykanen. Humanes CD7 hat 2 N-gebundene Glykane und viele O-gebundene Glykane (*Sempowski, Lee et al. 1999*). Die Anordnung dieser Glykane scheint optimal zu sein, um Gal-1 zu binden (*Sgroi, Nocks et al. 1996*). Weiterhin müssen CD7-positive-Zellen bestimmte Glykosyltransferasen exprimieren, um das Todessignal zu erhalten (*Galvan, Tsuboi et al. 2000*). Pace et al. konnten zeigen, dass CD7 für den Gal-1 induzierten T-Zell-Tod benötigt wird (*Pace, Hahn et al. 2000*).

Im Gegensatz zu dieser proapoptotischen Aktivität bewirkt die Gal-1 Sekretion in Stromazellen von Lymphknoten das Überleben naiver T-Zellen, ohne die Proliferation zu fördern (*Endharti, Zhou et al. 2005*). Zudem inhibiert Gal-1 die T-Zell-Adhäsion über Glykoproteine der Extrazellulärmembran wie Fibronektin und Laminin und reduziert die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ durch aktivierte T-Zellen. Das spricht dafür, dass Gal-1 seine anti-inflammatorischen Effekte auch unabhängig vom programmierten Zelltod ausüben kann (*Rabinovich, Ariel et al. 1999*).

Gal-1 stellt außerdem einen Schlüsseffektor in der Regulierung von Regulatorischen T-Zellen (TReg-Zellen) dar (*Garin, Chu et al. 2007*). TReg-Zellen sind bedeutend in der Regulierung selbst-reaktiver T-Zellen in der Peripherie (*Shevach 2000*). Diese Zellen stellen eine kleine Zellpopulation von CD4-positiven Zellen dar, die die α -Kette (CD25) des Interleukin-2R (IL-2R) Komplexes exprimieren (*Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995*). CD4⁺CD25⁺-T-Zellen können die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten sowohl auf Zytokin-abhängigem (*Seddon and Mason 1999*), als auch -unabhängigem Weg (*Suri-Payer and Cantor 2001*) inhibieren. Nach polyklonaler T-Zell-Rezeptor (TCR)- Aktivierung der TReg-Zellen kommt es nicht zur Produktion von IL-2, IL-10, IL-4 oder Interferon- γ (*Thornton and Shevach 1998*). Gal-1 ist nach TCR-Aktivierung jedoch hochreguliert. Zudem kann die spezifische Blockade der Gal-1-Bindung humaner TReg-Zellen mit einem neutralisierenden Gal-1 mAK (monoklonalen Antikörper), die inhibitorischen Effekte von humanen CD4- und CD25-coexprimierenden T-Zellen hemmen. Die TReg-Zellen der Gal-1-Null-Mäuse zeigen eine weniger inhibierende Wirkung als die der Wildtyp-Mäuse.

1.3.5.2 Therapeutische immunologische Wirkung von Gal-1

Die therapeutische Wirkung von Gal-1 wurde bereits in mehreren Studien untersucht. In einem murinen Modell von Stammzelltransplantation supprimierte Gal-1 die Graft-versus-host-Immunantwort (GvH) und die Produktion von Typ I-Zytokinen. Das Überleben der Mäuse wurde von 3% (Kontrollen) auf 68% (mit Gal-1 behandelte Mäuse) verbessert. Zudem konnten bei den unbehandelten Mäusen auch mehr inflammatorische Infiltrate im Gewebe nachgewiesen werden. Bei den mit Gal-1 behandelten Mäusen wurde außerdem die Wiederherstellung der normalen Milzstruktur gefördert (*Baum, Blackall et al. 2003*).

Gal-1 wurde auch in tierexperimentellen Modellen erfolgreich zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten eingesetzt. Bei der experimentellen Autoimmun-Uveitis,

einem T-Helfer 1-vermittelten Erkrankung der Retina, wurde nach Behandlung mit Gal-1 eine Inhibierung von Leukozyteninfiltration und pathogenen Th1-Zellen, eine Verbesserung der klinischen Symptomatik und außerdem eine Förderung der Apoptose in Lymphknoten der behandelten Mäuse erzielt (*Toscano, Commodaro et al. 2006*).

In einem murinen Diabetes-Mellitus-Modell führte außerdem die intravenöse Gabe von Gal-1-produzierenden dendritischen Zellen zu einer erhöhten Rate an apoptotischen T-Zellen und einer Inhibierung von Interferon- γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen in Pankreaslymphknoten (*Perone, Bertera et al. 2006*). In einem weiteren murinen Diabetes mellitus Typ 1-Modell wurden nach der Galektin-Therapie die Th1 Zellen signifikant reduziert und periphere (pankreatische) Betazell- reaktive T-Zellen zerstört (*Perone, Bertera et al. 2009*).

Gal-1 hemmt auch akute Entzündungsreaktionen *in-vivo*. In einem experimentellen Ansatz in Ratten führte die Injektion von Phospholipase-A2 zu einer Entzündungsreaktion. Gal-1 konnte die histamininduzierte Ödemreaktion in den Rattenhinterpfoten reduzieren. Histopathologisch wurde eine Hemmung der polynukleären neutrophilen Granulozyten und den degranulierten Mastzellen nachgewiesen (*Rabinovich, Sotomayor et al. 2000*).

Weiterhin konnte ein therapeutischer Effekt von Gal-1 in einem murinen Autoimmunhepatitis- (*Santucci, Fiorucci et al. 2000*), Kolitis- (*Santucci, Fiorucci et al. 2003*), Autoimmunenzephalitis- (*Offner, Celnik et al. 1990*) und Arthritis-Modell (*Rabinovich, Daly et al. 1999*) nachgewiesen werden.

1.3.5.3 Einfluss auf die fetomaternale Immuntoleranz durch Gal-1

Multiple Mechanismen beeinflussen die Immuntoleranz an der fetomaternalen Grenzfläche: unter anderem das Th1-Th2-Gleichgewicht, die spezifische Rekrutierung CD4⁺CD25⁺-TReg-Zellen, die Expansion der NK-Zellen und die Induzierung der dezipualen T-Zell Apoptosis (*Rabinovich and Ilarregui 2009*).

In einem Stressinduzierten murinen Abort-Model führte die Gal-1 Expression und die Therapie mit rekombinantem Gal-1 zu einer geringeren Anzahl von Aborten, indem das Th1-Th2 Gleichgewicht wiederhergestellt wurde und die Expansion von IL-10 produzierenden TReg-Zellen induziert wurde (*Blois, Ilarregui et al. 2007*). Außerdem konnten Kopcow et al. zeigen, dass humane dezipuale NK-Zellen hohe Mengen an Gal-1 produzieren, das zur Apoptose von dezipualen, jedoch nicht von peripheren T-Zellen führt (*Kopcow, Rosetti et al. 2008*).

1.3.6 Effekte auf die Tumorprogression durch Gal-1

Gal-1 wird eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression in vielen verschiedenen Tumoren zugeschrieben. Die Aggressivität und der metastasierende Phänotyp korrelieren hierbei oft mit der Expression von Gal-1. Diese wurde in malignem Gewebe unter anderem in Kolon- (*Hittelet, Legendre et al. 2003*), Prostata- (*van den Brule, Waltregny et al. 2001*), Glioma- (*Rorive, Belot et al. 2001*), Thyroid- (*Chiariotti, Berlingieri et al. 1995*), Cholangio- (*Shimonishi, Miyazaki et al. 2001*), Pankreas- (*Berberat, Friess et al. 2001*), Ovarial- (*van den Brule, Califice et al. 2003*) Urothel- (*Langbein, Brade et al. 2007*), oralen Plattenepitel- (*Ding, Dong et al. 2009*), pulmonalen Adenokarzinomen (*Wu, Hong et al. 2009*) und Vulvakarzinomen (*Kohrenhagen, Voelker et al.*) beschrieben.

Die klinische Bedeutung von Gal-1 in tumorassoziertem Stromagewebe konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Die Überexpression von Gal-1 in Stromagewebe von Prostatakarzinomen korreliert überdies mit der schlechten Prognose der Patienten (*van den Brule, Waltregny et al. 2001*). Außerdem wird Gal-1 mRNA in stromalen Fibroblasten von Pankreaszellkarzinomen (*Berberat, Friess et al. 2001*) und in peritumoralen Fibroblasten von humanen Ovarialkarzinomen exprimiert. Gal-1 wird zudem von aktivierten Fibroblasten sezerniert (*van den Brule, Califice et al. 2003*). Jung et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Gal-1 Expression in tumorassoziertem Stromagewebe mit klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorinvasion, T- Stadium, TNM-Stadium und axillärer Lymphknotenmetastasierung korreliert (*Jung, Moon et al. 2007*).

Gal-1 beeinflusst die Tumorprogression auf vielen Ebenen: in der Protoonkogenenmutation, der Zelladhäsion, der Angiogenese und der Immuntoleranz.

1.3.6.1 Einfluss auf die Proto-Onkogenmutation durch Gal-1

In humanen Tumoren sind Ras-Proto-Onkogene häufig mutiert und induzieren eine maligne Entartung. Die Ras-Transformation benötigt eine Membranverankerung, die durch die Überexpression von Gal-1 begünstigt wird. Zudem wird die Konversion von inaktivem Ras-GDP zu aktivem Ras-GTP gefördert (*Paz, Haklai et al. 2001*).

Gal-1 verlängert die Aktivierung von Ras über eine Farnesyl-Bindung und verhindert gleichzeitig die Bindung zur Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K). Wenn Gal-1 mit H-Ras interagiert, gewinnt es eine Ras (35S) Effektor-Loop-Mutationskonformation, die eine Aktivierung vom Raf1-MEK-ERK (Rapidly growing fibrosarcoma - Mitogen aktivierte

Proteinkinase - Extrazellulär regulierte Kinase) Signalweg induziert, welcher aus einer linearen Sequenz aus drei Proteinkinasen besteht, bei der die Aktivierung durch Phosphorylierung übermittelt wird: Raf1, MEK und ERK (*Sugden and Clerk 1997; Elad-Sfadia, Haklai et al. 2002*).

1.3.6.2 Einfluss auf die Zelladhäsion bei der Tumorprogression durch Gal-1

Gal-1 interagiert mit Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Laminin, Fibronectin, 90 K (MAC-BP) und Integrin, und reguliert somit Zell-Zell und Zell-ECM Adhäsion. Es modifiziert Zellmotilität und Aggregation, welche wichtige Stufen in der Tumorzellinvasion und Metastasierung darstellen (*Hughes 2001*).

Dimerisches Gal-1 bindet $\beta 1$ -Integrin und erhöht dessen Aktivität (*Moiseeva, Williams et al. 2003*). In einem transgenen murinen Model von humanem Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass die $\beta 1$ -Integrin Expression entscheidend für die Initiation des Zellwachstums der Karzinomzellen ist (*White, Kurpios et al. 2004*). In humanen epithelialen Tumoren hemmt Gal-1 das Wachstum über eine Integrin-abhängige Zellzyklus-Regulierung. Gal-1 bindet an den $\alpha 5 \beta 1$ -Fibronectin-Rezeptor und inhibiert die Ras-MEK-ERK-Kaskade und die G1/S-Zellzyklusprogression (*Fischer, Sanchez-Ruderisch et al. 2005*). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Gal-1 in mesenchymalen Zellen mit $\alpha 7 \beta 1$ - und $\alpha 1 \beta 1$ -Integrin (*Gu, Wang et al. 1994*) und in T-Zellen mit β -Integrin interagiert, was darauf hinweist, dass eine zellspezifische Integrinexpression verschiedene Effekte von Gal-1 in mesenchymalen, lymphoiden und epithelialen Tumorzellen hervorruft (*Moiseeva, Spring et al. 1999; Sturm, Lensch et al. 2004*).

1.3.6.3 Einfluss auf die Angiogenese bei der Tumorprogression durch Gal-1

Gal-1 wird in Endothelzell-Tumoren überexprimiert. Die Stimulierung aktivierter Endothelzellen mit einem Gal-1 spezifischen antisense-Oligodesoxynukleotid sowie mit einem polyklonalen Anti-Gal-1-Antikörper resultiert außerdem in einer Proliferations- und Migrationshemmung (*Thijssen, Postel et al. 2006*). Die Gal-1 Sekretion durch Endothelzellen fördert insbesondere die H-Ras Interaktion zur Raf/MAPK/ERK Kinase (MEK)/ERK Kaskade (*Thijssen, Barkan et al.*). Gal-1 vermittelt außerdem die angiostatische Aktivität von Anginex, welches das Tumorstadium hemmt, indem es die Tumorangio-genese inhibiert. Gal-1 dient dem Peptid als Rezeptor. Im Vergleich zum Wildtyp (Gal-1^{+/+}), hatte Anginex in Gal-1-Null Mäusen (Gal-1^{-/-}) keinen Effekt auf das Tumorstadium. In Gal-1-Null Mäusen

(Gal-1^{-/-}) war außerdem das Tumolvolumen nach 15 Tagen viermal geringer als in Wildtyp-Mäusen. Daraus kann man schließen, dass Gal-1 für die Tumorangiogenese benötigt wird und es somit als Targetprotein in der angiostatischen Therapie fungieren könnte (*Thijssen, Postel et al. 2006*).

1.3.6.4 Einfluss auf die Immuntoleranz bei der Tumorprogression durch Gal-1

Gal-1 beeinflusst die T-Zellhomöostase durch T-Zell Apoptose und Inhibierung von proinflammatorischen Zytokinen (*Rabinovich, Ariel et al. 1999; Rabinovich, Daly et al. 1999*). In murinen Melanomzellen führte die Hemmung der Gal-1 Expression durch die Transfektion mit einer Gal-1-antisense-cDNA zu einer Verbesserung der Tumorabwehr und zu einer CD4⁺ - und CD8⁺ -T-Zell vermittelten tumorspezifischen Immunantwort (*Rubinstein, Alvarez et al. 2004*).

Gal-1 trägt auch auf einem weiteren Weg zur Erhaltung der Immuntoleranz von Tumoren bei: unter Hypoxiebedingungen, bei der die maligne Transformation beschleunigt ist und dem Tumor eine zelluläre Resistenz gegenüber Chemotherapie verliehen wird (*Yun and Giaccia 2003*), war die Produktion und Sekretion von Gal-1 in Kopf- und Halsplattenepithelkarzinomen hochreguliert, die T-Zell-Produktion hingegen inhibiert. Gal-1 könnte also als Zielprotein in der hypoxischen Tumorthherapie dienen (*Le, Shi et al. 2005*).

1.4 Trophoblastzellen

1.4.1 Physiologie der Plazenta

Die Befruchtung und daraus folgend die Verschmelzung der männlichen und weiblichen Gameten erfolgt 6-12 Std. nach der Ovulation in der Ampulle des Eileiters. Bei der Furchung gehen Blastomeren aus einer Serie von Zellteilungen hervor. Am 3. Tag nach der Befruchtung erreicht die Zygote, daher die befruchtete Eizelle, im 12-16-Zellen Stadium als Morula die Gebärmutterhöhle. Hier verliert sie ihre Zona Pellucida, ihre Schutzhülle, und bildet eine Blastozystenhöhle aus. Die Blastozyste bildet eine äußere Zellschicht, aus der der Trophoblast, der embryonale Teil der Plazenta, entsteht, und eine innere Zellmasse, aus welcher der Embryo hervorgeht. Im Verlauf der 2. Woche dringt die Blastozyste mit dem embryonalen Pol in die Gebärmutterschleimhaut ein (Implantation). Im Kontakt mit der Schleimhaut verdickt sich der Trophoblast und besteht aus einer inneren Schicht mit einkernigen Zellen, dem Zytotrophoblasten, und einer äußeren, vielkernigen Schicht, dem Synzytiotrophoblasten. Im Zytotrophoblast teilen sich die Zellen und verschmelzen

unter Verlust der eigenen Membran mit dem Synzytiotrophoblasten. Dieser gewinnt somit stetig an Dicke. Die Zellen im Endometrium beladen sich mit Glykogenen und Lipiden, das Gewebe wird ödematös (deziduale Reaktion). Am embryonalen Pol erscheinen Vakuolen im Synzytium, welche zusammenfließen und weite Lakunen bilden. Mit dem weiteren Eindringen entwickeln sich Verbindungen zwischen den Lakunen und dem mütterlichen Kreislaufsystem. Zwischen den Lakunen bleiben Trabekel (synzytiotrophoblastäre Zellsäulen) als trennende Grenzen stehen. Zytotrophoblastzellen wachsen in die Trabekel hinein, welche damit zu primären Zotten werden. Zellen aus dem extraembryonalen parietalen Mesoderm (Chorionmesoderm) dringen in den Zottenkern ein. Dadurch entsteht die Sekundärzotte. Das villöse Mesenchym durchdringt die trophoblastäre Hülle nicht vollständig, so dass die basalen Segmente der Trabekel im Primärzottenstadium verbleiben. Der trophoblastäre Fuß der Trabekel, bzw. der Ankerzotten, ist der Entstehungsort des extravillösen Trophoblasten. Embryonale Blutgefäße entstehen innerhalb des Mesenchyms und wandeln die Sekundär- in Tertiärzotten um. Die villösen Zytotrophoblasten bilden die innere Schicht der Chorionzotten. Sie proliferieren und fusionieren zu Synzytiotrophoblasten. Sie synthetisieren schwangerschaftsassozierte Hormone und Proteine und bilden die funktionelle Barriere zwischen maternalem Blut und fötalem Stroma. Zytotrophoblastzellen lösen sich von der Basalmembran der Ankerzotten, durchwandern die synzytiotrophoblastäre Schicht und bilden als extravillöse Trophoblasten Zellsäulen. Von hier aus wandern Zellen in die Dezidua und das Myometrium ein und verändern das Endometrium und das Gefäßsystem (siehe Abb. 5).

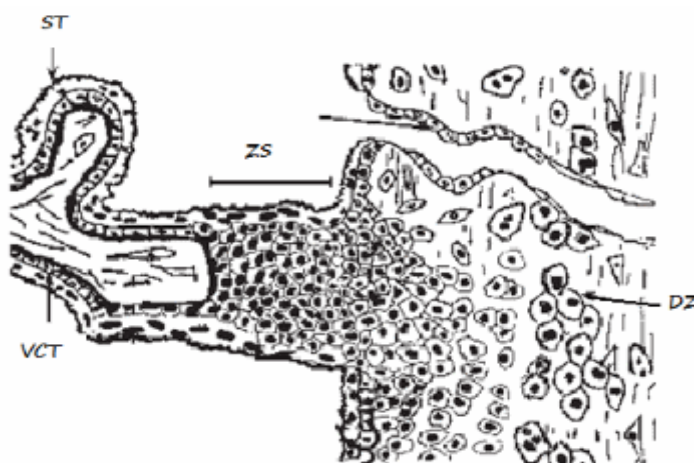


Abb. 5: ST = Synzytiotrophoblast, VZT = villöser Zytotrophoblast, ZS = Zellsäule, DZ = Deziduazelle (Modifiziert nach (Malassine and Cronier 2002)).

1.4.2 Trophoblasttumorzellen BeWo

Obwohl es naheliegend wäre, die Effekte von Gal-1 auf die Synzytiumbildung in Trophoblastzellen von primären Zellkulturen zu untersuchen, dienten in dieser Studie Trophoblasttumorzellen BeWo als Untersuchungsmaterial. Primäre Zellkulturen stellen eine heterogene Population von isolierten Zyto- und Synzytiotrophoblastzellen dar und weisen eine Variabilität in der Zellproliferation und Zellfusion auf. Der Einsatz von etablierten Zelllinien in der Untersuchung der Trophoblastenfunktion wurde von vielen Wissenschaftlern befürwortet (*Ringler and Strauss 1990; King, Thomas et al. 2000*) und letztlich nochmals durch Sullivan bestätigt (*Sullivan 2004*). Die Trophoblasttumorzelllinie BeWo wurde 1968 durch Pattillo et al. etabliert (*Pattillo and Gey 1968*). Diese Zelllinie weist zwei koexistierende Phänotypen auf: einen Zytotrophoblast-ähnlichen, und einen Synzytiotrophoblast-ähnlichen Phänotyp (*Grummer, Hohn et al. 1994*).

1.4.3 Hormonsynthese in der Plazenta

Humanes Choriongonadotropin (hCG) ist ein heterodimeres Glykoprotein, das aus α - und β -Einheiten gebildet wird. Die hCG-Untereinheiten werden schon im 8-Zell-Stadium transkribiert. Der Trophoblast synthetisiert das Hormon bereits bevor es im maternalen Serum messbar ist, d.h. 8-10 Tage nach der Ovulation (*Jameson and Hollenberg 1993*) (*Srisuparp, Strakova et al. 2001*). Die hCG-Konzentration steigt exponentiell an und erreicht ein Maximum ca. 6 Wochen nach der Ovulation. Danach fallen die hCG-Werte langsam ab und erreichen ihren Tiefstand am Anfang des zweiten Trimesters. In den ersten sechs Schwangerschaftswochen ist hCG für die Schwangerschaftsaufrechterhaltung essentiell, indem es den Gelbkörper zur Ausschüttung von Progesteron stimuliert (*Malassine and Cronier 2002*).

In der Plazenta wird Pregnenolon aus Cholesteron durch das Zytochrom P450_{scc} (side chain cleavage enzyme) gebildet. Anschließend wird Pregnenolon durch die 3- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Progesteron umgewandelt (*Morel, Mebarki et al. 1997*) (*Beaudoin, Bonenfant et al. 1997*). Während dem Menstruationszyklus wird Progesteron durch den Gelbkörper produziert. Nach der Befruchtung und Implantation produziert der Gelbkörper weiterhin Progesteron unter dem Einfluss von hCG. 6-8 Wochen nach der Ovulation sinkt die Progesteronproduktion durch den Wegfall der Stimulierung durch den Synzytiotrophoblasten (s. oben) (*Aspillaga, Whittaker et al. 1983*).

Die Plazenta übernimmt nun die Progesteronproduktion. Da die humane Plazenta keine Zytochrom P450 17- α -Hydroxylase exprimiert, kann sie Pregnenolon oder Progesteron nicht zu Androgenen für die Synthese von Östrogenen umwandeln. Daher hängt die Östrogensynthese von Androgen-Vorstufen ab (Dehydroepiandrosteron-Sulfat [DHEA-S]), die durch die maternale Nebenniere (zu 50%) und die fötale Nebenniere (zu 50%) produziert werden. DHEA und DHEA-S diffundieren von dem fötalen Blut zu dem Synzytiotrophoblasten, werden durch eine Steroidsulfatase hydrolysiert und durch die synzytiotrophoblastäre Zytochrom P450-Aromatase in Östrogen umgewandelt (*Strauss, Martinez et al. 1996*) (*Malassine and Cronier 2002*).

1.4.4 Galektin-1 und Trophoblastzellen

Gal-1 wird initial im Trophektoderm von dem expandierten Blastozysten unmittelbar vor der Implantation synthetisiert (*Poirier, Timmons et al. 1992*). Es wird durch den Synzytiotrophoblasten, jedoch nicht durch den villösen Zytotrophoblasten exprimiert. Der in die Dezidua eindringende Zytotrophoblast exprimiert Gal-1 nur schwach, Trophoblasttumorzellen BeWo Zellen dagegen besonders stark (*Walzel, Neels et al. 1995; Vicovac, Jankovic et al. 1998*). Gal-1 bindet Trophoblasten und BeWo Zellen, welche ein Synzytium *in-vitro* bilden, jedoch nicht frisch isolierte Trophoblastzellen aus dem ersten Schwangerschaftstrimester und Zellen der Trophoblasttumorzelllinie JEG-3, welche kein Synzytium bilden können (*Jeschke, Reimer et al. 2004*).

Das Thomsen–Friedenreich Epitop (TF-Antigen) beinhaltet das Kohlenhydratmolekül Galactose- β 1–3N-acetylgalactosamine (Gal β 1–3GalNAc). Es wird in mehr als 85% der humanen Karzinome exprimiert (*Springer 1984*). Außerdem ist es ein blutgruppenbezogenes spezifisches onkofetales Antigen und ist in normalem Gewebe nur begrenzt vorhanden (*Cao, Stosiek et al. 1996*). Trotzdem wird es von fetalen Epithelien und Mesothelien (*Barr, Taylor et al. 1989*) und von Trophoblastzellen exprimiert (*Richter, Jeschke et al. 2000*). Das TF-Antigen wird von Synzytiotrophoblasten an der materno-fetalen Grenzfläche, durch extravillöse, in die Dezidua eindringende Trophoblasten und durch Trophoblasttumorzellen BeWo, die ein Synzytium bilden, exprimiert. Isolierte Zytotrophoblasten und Zellen der JEG-3 Trophoblasttumorzelllinie, die kein Synzytium bilden können, exprimieren hingegen kein TF-Antigen.

Es ist daher vorstellbar, dass das TF-Antigen in Adhäsionsprozesse involviert ist, die zu der Bildung von multizellulären Aggregaten führen. Da Synzytiotrophoblasten *in-*

vivo auch das TF-Antigen exprimieren, repräsentieren die TF-positiven Zellen höchstwahrscheinlich den Synzytiotrophoblast-ähnlichen Phänotypen (*Jeschke, Richter et al. 2002*). Dieses Expressionsschema von Gal-1 ist in Übereinstimmung mit der TF-Antigen Expression. Jeschke et al. konnten zeigen, dass Gal-1 an das TF-Antigen in Synzytiotrophoblasten, extravillösen Trophoblastzellen und Trophoblasttumorzellen BeWo bindet (*Jeschke, Karsten et al. 2006*).

Gal-1 hat einen biphasischen Effekt auf die Zellproliferation (*Adams, Scott et al. 1996*). In BeWo-Zellen inhibiert Gal-1 die Proliferation in einer konzentrationsabhängigen Weise: die Proliferation ist bei hohen Konzentrationen (30 und 60 µg/ml) im Gegensatz zu niedrigen Konzentrationen (10 und 20 µg/ml) signifikant reduziert (*Jeschke, Karsten et al. 2006*).

Gal-1 beeinflusst auch die Hormonsynthese: es inhibiert die hCG- und Progesteron-Produktion in BeWo Zellen. Die hCG-Produktion wird sowohl auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene gehemmt. Die Effekte scheinen mit der Expression von dem TF-Antigen auf der Zelloberfläche in Verbindung zu stehen (*Jeschke, Reimer et al. 2004*).

Obwohl zahlreiche Signalwege in Trophoblastzellen in den letzten Jahren erörtert wurden, darunter Mitglieder der mitogen-activated protein Familie (MAPK) (*Daoud, Amyot et al. 2005*) (*Kita, Mitsushita et al. 2003*), der Janus Kinase (JAK) und der Signal transducer and activator of transcription cytokine signal transducing pathway (STAT) (*Fitzgerald, Busch et al. 2005*; *Fitzgerald, Poehlmann et al. 2008*), besteht wenig Information bezüglich der durch Gal-1 beeinflussten Signalwege in diesen Zellen. Um die extra- und intrazellulären Bedeutung von Gal-1 in Trophoblastzellen zu verstehen, ist es notwendig, die interagierenden Glykokonjugate und Signalwege zu identifizieren. Rezeptor-Tyrosinkinasen spielen hierbei eine wichtige Rolle, da Tyrosin-Phosphorylierung zahlreiche biologische Prozesse kontrolliert, unter anderem die Zelldifferenzierung und -proliferation (*Hunter 1998*).

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Synzytiumbildung ist ein außergewöhnlicher Prozess, der nur in wenigen Zelllinien stattfindet. Einen besonderen Schauplatz stellt hier die Plazenta dar, deren Entstehung in vielen Aspekten der Invasion durch maligne Tumore ähnelt (*Hammer, Blaschitz et al. 1999*). Einige molekulare Mechanismen der Fusionsbildung der Trophoblastzellen wurden bereits aufgedeckt (*Getsios and MacCalman 2003*) (*Frendo, Cronier et al. 2003*). Allerdings gibt es noch viele extra- und intrazelluläre Abläufe, welche noch genau spezifiziert werden müssen. Ebenso ist es wichtig, die interagierenden Signalwege zu identifizieren. Es ist von großer Bedeutung, den genauen Ablauf dieses komplexen Mechanismus zu erforschen, um Krankheiten, welche das sensible Zusammenspiel zwischen Fötus und Plazenta stören, aufzudecken. Tatsächlich beeinflussen multiple Mechanismen die Immuntoleranz an der fetomaternalen Grenzfläche. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Galektin-1 hier eine große Rolle spielt (*Blois, Ilarregui et al. 2007*). Der Bindungsweg von Gal-1 an die Trophoblastzellen und die Beeinflussung der Proliferation sind daher von zentraler Bedeutung. Aufgrund der Tatsache, dass Galektin-1 als humanes Lektin mit zwei Kohlenhydratbindungsstellen (*Perillo, Pace et al. 1995; Walzel, Blach et al. 2000*) an Trophoblastzellen sowie an Trophoblasttumorzellen BeWo und insbesondere an das Thomsen-Friedenreich Epitop bindet, stellt sich die Frage, wie Gal-1 die Fusionsbildung von Trophoblasttumorzellen BeWo stimuliert (*Jeschke, Reimer et al. 2004*). Da es spezifisch die hCG- und Progesteronproduktion und die Proliferation von BeWo Zellen inhibiert (*Jeschke, Reimer et al. 2004*), stellt sich zudem die Frage, wie Gal-1 die Expression von weiteren Proteinen und die Signalweiterleitung in BeWo Zellen beeinflusst.

3 Material und Methoden

Ein detailliertes Bezugsquellenverzeichnis aller verwendeten Geräte und Chemikalien sowie die Zusammensetzung der verwendeten Medien befinden sich im Anhang.

3.1 In vitro Kultur der BeWo Zellen

Bei der Zellkultur handelte es sich um Trophoblasttumorzellen der Zelllinie BeWo (European Collection of Cell Cultures, ECACC, Salisbury, UK). Die Trophoblasttumorzelllinie BeWo wurde 1968 durch Pattillo und Gey etabliert (*Pattillo and Gey 1968*). Diese Zelllinie weist zwei koexistierende Phänotypen auf: einen Zytotrophoblast-ähnlichen, und einen Synzytiotrophoblast-ähnlichen Phänotyp (*Grummer, Hohn et al. 1994*).

Die Zellen wurden, abhängig von der Zelldichte, in T25, bzw. T175-Zellkulturflaschen in 6 ml, bzw. 25 ml DMEM Nährmedium (500 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 50 ml (= 10%) fetales Kälberserum) ausgesät und bei 37°C kultiviert (5% CO₂). Einmal wöchentlich wurde das Nährmedium steril entnommen und durch frisches ersetzt, einmal pro Woche erfolgte die Zellzählung.

3.2 Zellzählung

Das Medium wurde abgezogen und verworfen. Anschließend wurde die Kulturflasche mit PBS gewaschen. Es wurde eine definierte Menge an Trypsin zugeführt (T25: 1 ml und T175: 3 ml) um adhärente Zellen vom Boden zu lösen. Nun wurde die Suspension in einer bestimmten Menge Nährmedium verdünnt (T25: 4 ml und T175: 12 ml). 25 µl dieser Suspension wurden mit 50 µl PBS und 25 µl Trypanblau vermengt. Dieser Farbstoff dringt bei beschädigter Zellmembran in die Zelle ein und färbt sie blau. So kann man zwischen vitalen und toten Zellen unterscheiden. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Es wurden dann jeweils 4 × 16 Kästchen ausgezählt. Die Summe der Zellzahl wurde durch 4 dividiert. Je nach Verdünnung im Medium wurde die ermittelte Anzahl X dann mit dieser Verdünnung multipliziert. Die so errechnete Zellzahl entsprach dann $X \times 10^4$ Zellen absolut. Es wurde im Anschluss eine neue Passage durch das Aussäen einer gewissen Anzahl an Zellen in eine Zellkulturflasche mit Zellmedium angelegt.

3.3 Immunzytochemie

3.3.1 Anfertigen von Chamberslides für die Immunzytochemie

Es wurden insgesamt 6 Chamberslides für die Immunzytochemie angelegt. Ein Chamberslide enthielt je vier Kammern. Je 100.000 Zellen wurden in 1 ml DMEM/FCS Kulturmedium pro Kammer ausgesät. Galektin-1 wurde in drei der vier Kammern von jedem Chamberslide in ansteigender Konzentration zugesetzt: 10 µg/ml, 30 µg/ml und 60 µg/ml. Die jeweilig vierte Kammer diente als Negativ-Kontrolle (nur Zellmedium). Die Zellen von drei Chamberslides (Ki67, β -Catenin und Leptin) wurden für 24 h bei 37°C kultiviert (5% CO₂), die Zellen der drei weiteren für 48 h (je einer für Ki67, β -Catenin und Leptin). Anschließend wurden die Überstände abgezogen.

3.3.2 ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Peroxidase-Methode

Zum Nachweis von β -Catenin, Ki67 und Leptin wurde die Avidin-Biotin-Complex-Peroxidase-(ABC)-Methode angewendet.

Diese Methode basiert auf der hohen Affinität vom Glykoprotein Avidin zum B-Vitamin Biotin. Da es teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, wurde auf gentechnischem Weg ein reineres Produkt gewonnen: das Streptavidin, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird.

Bei der Avidin-Biotin-Verbindung ist an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden. An diesen Komplex ist das Enzym Peroxidase gekoppelt, das aus der Meerrettichwurzel gewonnen wird und ein Molekulargewicht von 40 kDa hat.

Über einen gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteten biotinylierten, d.h. mit Biotin markierten Brückenantikörper, wird der Primärantikörper mit dem vorgeformten Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex verbunden (siehe Abb. 6).

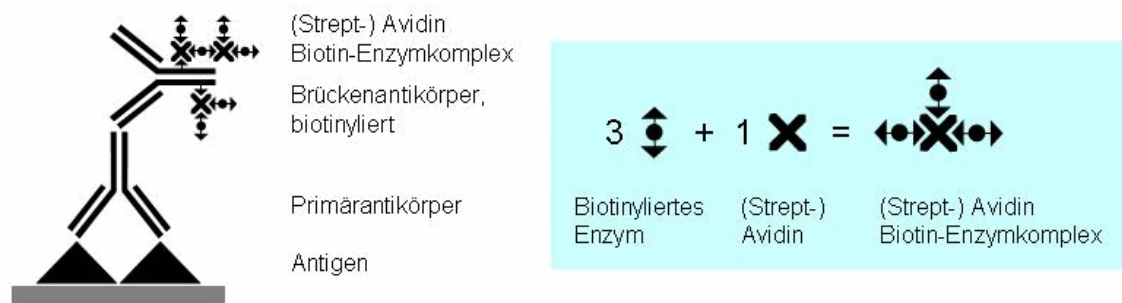


Abb. 6: Noll S, Schaub-Kuhnen S: *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena, Urban & Fischer, 2000, pp 147.

Es kommt zu einer Farbreaktion, indem die Peroxidase mit dem Substratpuffer H_2O_2 und dem Chromogen, in diesem Fall AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), ein rotbraunes Endprodukt bildet. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalun nach Mayer: es handelt sich hierbei um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung (pH-Wert von 4,5). In diesem sauren Milieu lagern sich die positiv geladenen basischen Farbstoffe an die negativ geladene Phosphatgruppe der Kern-DNA an. Das anschließende Bläuen und Auswaschen erfolgte im Leitungswasser. Das Eindecken erfolgte mit Aquatex auf wässriger Basis, da AEC in organischem Lösungsmittel löslich ist. Es hat den gleichen Brechungsindex wie Glas und verschließt die Präparate luftdicht (siehe Abb. 7).

Schema der ABC-Methode

Alle Inkubationen werden soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und in der feuchten Kammer durchgeführt.

Vorbereitung der Seren:

-Normalserum = 3 Tropfen Normalserum + 10 ml steriles PBS

-Sekundärantikörper = 3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Anti-Mouse-Ig/bzw. Anti-Rabbit-Ig/bzw. Anti-Sheep-Ig + 10 ml PBS

-ABC-Komplex = 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10 ml steriles PBS (die Lösung muss 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt werden)

-Mit PBS spülen	5 min
-50% Ethanol/50% Methanol	10 min
-Lufttrocknen	ca. 15 min
-Mit PBS spülen	5 min
-Normalserum	30 min
-Serum entfernen, nicht spülen	
-Primärantikörper	4°C 18h
-Mit PBS/Brij spülen	5 min
-biotinylierter Brückenantikörper	30 min
-Mit PBS/Brij spülen	5 min
-ABC-Komplexelite	30 min
-Mit PBS spülen	5 min
-AEC	10-12 min
-fließend wässern (lauwarmes Wasser)	
-in Hämalun: Kern-Gegenfärbung	30 sec
-fließend wässern	
-eindecken mit Aquatex	
-trocknen	ca. 15 min

Abb. 7: Schema der ABC Methode.

Die Zellen wurden wie unter 3.3.1 beschrieben auf Chamberslides ausgesät und kultiviert. In Folge wurden die Zellen 10 min mit 50% Ethanol/50% Methanol fixiert und getrocknet. Anschließend wurden die Chamberslides 5 min in PBS gewaschen, um Reste des Ethanols und Methanols zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen Chamberslides mit „Horse“- Normalserum aus dem Vectastain-ABC-Elite-Kit (Fa. Vector) bedeckt. Nach 30 min wurde das Serum entfernt. Die enthaltenen Serumproteine lagern sich an die für den Primärantikörper unspezifischen Bindungsstellen an und blockieren diese: somit wird eine unspezifische Anfärbung reduziert bzw. nahezu verhindert.

Zusätzlich wurden entsprechende Negativ-Kontrollen für die jeweiligen Antikörper durchgeführt, indem BeWo Zellen mit Maus IgG, Kaninchen IgG bzw. Schaf IgG in einer Konzentration von 2-10 µg/ml inkubiert wurden. Desweiteren wurden Positiv-Kontrollen für die einzelnen Antikörper angefertigt: die Leptin Positiv-Kontrolle an Plazenta-Gewebe, die E-Cadherin-, β -Catenin- und Ki67 Positiv-Kontrolle an Mamma-Karzinom-Gewebe.

Für die immunzytochemischen Reaktionen wurden die jeweiligen Chamberslides mit dem entsprechenden Primärantikörper gegen β -Catenin, Ki67 und Leptin bedeckt: die Inkubation erfolgte 18 h bei 4°C in der feuchten Kammer. Die optimale Verdünnung der Primärantikörper musste vorher ermittelt werden, um eine deutliche Anfärbung bei reduzierter Hintergrundfärbung zu erreichen (siehe Abb. 8).

Antikörper	Isotyp	Klon	Verdünnung in PBS, pH 7,2-7,4	Inkubation	Firma
<i>β-Catenin</i>	<i>Rabbit IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:600</i>	<i>18 h, 4°C</i>	<i>Diagnostic Biosystems</i>
<i>Ki67</i>	<i>Mouse IgG</i>	<i>Mib-1</i>	<i>1:500</i>	<i>18 h, 4°C</i>	<i>DAKO</i>
<i>Leptin</i>	<i>Sheep IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:10 000</i>	<i>18 h, 4°C</i>	<i>AbD Serotec</i>

Abb. 8: Tabelle der verwendeten Antikörper, Immunzytochemie.

Am nächsten Tag wurden die Chamberslides zuerst 5 min in mit Brij versetztem PBS gewaschen, um die Oberflächenspannung der Präparate zu reduzieren. So konnten überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt werden.

Anschließend wurden die Chamberslides 30 min mit dem biotinylierten Brückenantikörper inkubiert und anschließend erneut 5 min in mit Brij versetztem PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Chamberslides 30 min mit dem ABC-Elite-Komplex bedeckt und 5 min mit PBS gewaschen.

Im Anschluss wurden die Chamberslides 10-12 min mit AEC-Reagenz inkubiert. Es wurde währenddessen kontrolliert, wann die positiven Zellen ihre typische braun-rote Färbung erreichen. Nach Spülung unter fließendem Wasser wurden die Chamberslides für 30 sec in Hämalun getaucht, um die Zellen gegenzufärben. Anschließend wurden die Chamberslides für 5 min in Leitungswasser gebläut. Die Chamberslides wurden in Folge mit Aquatex eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Die positiven Zellen färbten sich braun-rötlich, die negativen bläulich.

3.3.3 Auswertung der Immunzytochemie

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop (*Leica, Solms, Deutschland*) durch drei unabhängige Begutachter, darunter die Pathologin Frau PD Dr. Doris Mayer. Zuerst wurden die Zellen bei Lupenvergrößerung (10-fach) aufgesucht. Anschließend wurden sie bei stärkerer Vergrößerung (25-fach) beurteilt. Parallel wurden Positiv- und Negativ-Kontrollen aus jeder Färbereihe mitgeführt, die die immunzytochemische Färbereaktion bestätigten. Mit Hilfe einer digitalen Kamera (*JVC; Victor Company of Japan, Japan*) wurden die entsprechenden Abbildungen erstellt.

3.3.3.1 Auswertung der Ki67 und Leptin Färbung

Die Schnitte wurden nach dem immunoreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner (*Remmele and Stegner 1987*) ausgewertet. Dieser semiquantitative immunoreaktive Score berücksichtigt die Parameter Färbeintensität (Staining Intensity = SI) und den Prozentsatz der immunzytochemisch positiven Zellen (PP) und wird aus dem Produkt dieser beiden Parameter errechnet.

Die Färbeintensität (SI) wird wie folgt unterteilt:

0 = keine Färbereaktion

1 = schwache Färbereaktion

2 = mäßige Färbereaktion

3 = starke Färbereaktion

Der Prozentsatz positiver Zellen (PP) wird eingeteilt in:

0 = keine positiven Zellen

1 = < 10% positive Zellen

2 = 10-50% positive Zellen

3 = 51-80% positive Zellen

4 = > 80% positive Zellen

Durch Multiplikation beider Parameter kann der IRS – Score einen Wert zwischen 0 und einem Maximalwert von 12 annehmen. Die Auswertung der Ergebnisse ergab folgende Expressionsgrade:

0 = keine Expression

1 – 3 = geringe Expression

2 – 8 = mäßige Expression

9 -12 = starke Expression

Der IRS-Score wurde anhand des nicht parametrischen Wilcoxon Tests verglichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von <0,05 beidseitig festgelegt.

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows®.

3.3.3.2 Auswertung der β -Catenin Färbung

Die Intensität der β -Catenin Färbung wurde anhand der prozentualen Veränderung des gefärbten Zellmembrananteils an der Zellanzahl gemessen. Bei 100% waren alle Zellmembranen positiv, bei 0% gar keine.

Der nicht parametrische Wilcoxon Test wurde genutzt, um die Färbeintensität zu vergleichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von <0,05 beidseitig festgelegt.

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows®.

3.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

3.4.1 Anfertigen von Chamberslides für die Immunfluoreszenz

Es wurden insgesamt 7 Chamberslides für die Immunfluoreszenz angelegt (3 für die Simultanexpression von E-Cadherin und Zytokeratin, 2 für die Simultanexpression von Anti- β -Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase, 2 für die Syncytin Expression).

Ein Chamberslide enthielt je vier Kammern. Pro Kammer wurden je 100.000 Zellen in 1 ml DMEM/FCS Kulturmedium ausgesät. In vier Chamberslides wurde für den E-cadherin und für den Anti- β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Versuch, Gal-1 in jeweils drei Kammern in ansteigender Konzentration zugesetzt: 10 μ g/ml, 30 μ g/ml und 60 μ g/ml. Die jeweilig vierte Kammer diente als Negativ-Kontrolle (nur Zellmedium). In einem weiteren Chamberslide wurde für den Syncytin Versuch 60 μ g/ml Gal-1 in

zwei Kammern zugesetzt, die zwei weiteren Kammern dienten als Negativ-Kontrollen (nur Zellmedium). In wiederum zwei Chamberslides wurde für den Syncytin und E-Cadherin Versuch 60 µg/ml Forskolin in zwei Kammern zugesetzt, die zwei weiteren Kammern dienten als Negativ-Kontrollen (nur Zellmedium). Die Zellen der Chamberslides wurden bei 37° C (5% CO₂) kultiviert. Nach 48 h wurde der Überstand abgezogen.

3.4.2 Durchführung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Bei der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wird eine Simultanexpression von zwei Proteinen an derselben Zelle nachgewiesen: hier wurde die Expression von E-Cadherin und Zytokeratin sowie die Expression von Anti-β-Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase an Trophoblasttumorzellen BeWo *in vitro* nachgewiesen. Außerdem wurde die Expression von Forskolin *in vitro* nachgewiesen.

Die angegebenen Inkubationen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

3.4.2.1 Erste Simultanexpression: E-Cadherin und Zytokeratin

Primär-AK	Isotyp	Klon	Verdünnung in DAKOS3022	Inkubation	Firma
<i>E-Cadherin</i>	<i>Mouse IgG1</i>	<i>HECD-1</i>	<i>1:80</i>	<i>über Nacht, 4°C</i>	<i>Calbiochem</i>
<i>Pan-Keratin Cy3</i>	<i>Mouse IgG</i>	<i>Klon A45-B/B3</i>	<i>1:1000</i>	<i>45 min, RT</i>	<i>Micromet</i>
Sekundär-AK	Isotyp	Klon	Verdünnung in DAKO S3022	Inkubation	Firma
<i>Rabbit-anti-mouse Cy2</i>	<i>Rabbit IgG</i>	<i>Polyclonal</i>	<i>1:50</i>	<i>30 min, RT</i>	<i>Dianova</i>

Abb. 9: Tabelle der verwendeten Antikörper, erste Simultanexpression, E-Cadherin und Zytokeratin.

Schema der ersten Simultanexpression	
Mit PBS spülen	3 × 2 min
Blockierung	15 min
<i>Ultra V Block: zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, d.h. zur Verhinderung unspezifischer Anfärbung</i>	
Serum entfernen, nicht spülen	
1. Primär-AK E-Cadherin:	16 h bei 4°C
Mit PBS spülen	3 × 2 min
ab hier im Dunkeln arbeiten	
Sekundär-AK Rabbit-Anti-Mouse IgG 1:50 mit Farbstoff Cy2 markiert → grün:	30 min
Mit PBS spülen	3 × 2 min
2. Primär-AK Pan-Keratin Klon A45-B/B3 Mouse IgG mit Farbstoff Cy3 markiert → rot:	45 min
Mit PBS spülen	3 × 2 min
Präparate im Dunkeln trocknen lassen	
Eindecken mit Mounting Medium für Fluoreszenz, mit DAPI versetzt	

Abb. 10: Schema der ersten Simultanexpression, E-cadherin und Zytokeratin.

Die Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben auf Chamberslides ausgesät und kultiviert. In Folge wurden die Zellen 10 min mit 50% Ethanol/50% Methanol fixiert und getrocknet. Dann wurden die Chamberslides mit PBS 3 × für 2 min gespült. Um eine unspezifische Färbung zu verhindern, wurden die Chamberslides mit Ultra V Block für 15 min inkubiert und anschließend entfernt.

Der Primärantikörper E-Cadherin wurde 1:80 verdünnt. Anschließend wurde er auf die Präparate aufgetragen. Die Chamberslides wurden über Nacht (ca. 16 h) im Kühlschrank (ca. 4°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Chamberslides erneut 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Die nächsten Arbeitsschritte sollten möglichst ohne Lichteinwirkung erfolgen, da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind, sonst schnell zerfallen würden.

Der mit dem grünen Farbstoff Cy 2 markierte Sekundärantikörper Rabbit-Anti-Mouse IgG (Fa. Dianova) wurde 1:50 verdünnt und auf die Präparate aufgetragen. Anschließend wurden die Chamberslides für 30 min inkubiert. In Folgedessen wurden die Chamberslides 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Der mit dem roten Farbstoff Cy3 markierte Mouse IgG-Antikörper wurde 1:1000 verdünnt und auf die Chamberslides aufgetragen. Anschließend wurden die Chamberslides für 45 min inkubiert. Erneut wurden die Präparate 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Nachdem die Präparate im Dunkeln getrocknet waren, wurden sie mit Mounting Medium der Fa. Vector, welches 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI) enthält, eingedeckt (siehe Abb. 9 und 10).

3.4.2.2 Zweite Simultanexpression: Anti-β-Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase

Primär-AK	Isotyp	Klon	Verdünnung in DAKOS3022	Inkubation	Firma
<i>Anti-β Hydroxy-Steroiddehydrogenase</i>	<i>Rabbit IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:15</i>	<i>über Nacht, 4°C</i>	<i>Biogenesis</i>
<i>Anti-P450-Aromatase</i>	<i>Mouse IgG2a</i>	<i>H4</i>	<i>1:60</i>	<i>60 min, RT</i>	<i>Acris</i>
Sekundär-AK	Isotyp	Klon	Verdünnung in DAKOS3022	Inkubation	Firma
<i>Goat-Anti-Rabbit Cy2</i>	<i>Rabbit IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:100</i>	<i>30 min, RT</i>	<i>Jackson Immunoresearch</i>
<i>Goat-Anti-Mouse Cy3</i>	<i>Mouse IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:500</i>	<i>30 min, RT</i>	<i>Jackson Immunoresearch</i>

Abb. 11: Tabelle der verwendeten Antikörper, zweite Simultanexpression, Anti-β Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase.

Schema der zweiten Simultanexpression	
Mit PBS spülen	3 × 2 min
Blockierung	15 min
<i>Ultra V Block: zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, d.h. zur Verhinderung unspezifischer Anfärbung</i>	
Serum entfernen, nicht spülen	
1. Primär-AK: Anti-β-Hydroxysteroiddehydrogenase	16 h bei 4°C
Mit PBS spülen	3 × 2 min
2. Primär-AK: Anti-P450-Aromatase	30 min
Mit PBS spülen	3 × 2 min
ab hier im Dunkeln arbeiten	
Beide Sekundärantikörper vorher im 1:1 Verhältnis mischen	30 min
Goat-anti-rabbit IgG mit Farbstoff Cy2 markiert → grün	
Goat-anti-mouse IgG mit Farbstoff Cy3 markiert → rot	
Mit PBS spülen	3 × 2 min
Präparate im Dunkeln trocknen lassen	
Eindecken mit Mounting Medium für Fluoreszenz, mit DAPI versetzt	

Abb. 12: Schema der zweiten Simultanexpression, Anti-β Hydroxysteroiddehydrogenase und Anti-P450-Aromatase.

Die Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben auf Chamberslides ausgesät und kultiviert. In Folge wurden die Zellen 10 min mit 50% Ethanol/50% Methanol fixiert und getrocknet. Anschließend wurden die Chamberslides mit PBS 3 × für 2 min gespült. Um eine unspezifische Färbung zu verhindern, wurden die Chamberslides mit Ultra V Block für 15 min inkubiert und anschließend entfernt.

Der erste Primärantikörper Anti-β-Hydroxysteroiddehydrogenase wurde 1:15 verdünnt und auf die Präparate aufgetragen. Die Inkubierung erfolgte über Nacht (ca. 16 h) im Kühlschrank (ca. 4°C). Am nächsten Tag wurden die Chamberslides erneut 3 × für 2 min mit PBS gespült. Anschließend wurde der zweite Primärantikörper Anti-P450-Aromatase 1:60 verdünnt und auf die Präparate aufgetragen. Die Präparate wurden für 60 min inkubiert und anschließend erneut 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Die nächsten Arbeitsschritte sollten möglichst ohne Lichteinwirkung erfolgen, da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind, sonst schnell zerfallen würden.

Die beiden Sekundärantikörper wurden erst folgendermaßen verdünnt: Goat-anti-rabbit IgG mit dem grünen Farbstoff Cy2 markiert: 1:100 und Goat-anti-mouse IgG mit dem roten Farbstoff Cy3 markiert 1:500. Die Antikörper wurden anschließend in einem 1:1 Verhältnis vermischt, auf die Präparate aufgetragen. Nach 30 min wurden die Chamberslides 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Nachdem die Präparate im Dunkeln getrocknet waren, wurden sie mit Mounting Medium der Fa. Vector, welches DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol) enthält, eingedeckt (siehe Abb. 11 und 12).

3.4.2.3 Syncytin Expression

Primär-AK	Isotyp	Klon	Verdünnung in DAKOS3022	Inkubation	Firma
<i>Syncytin</i>	<i>Rabbit IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:20</i>	<i>über Nacht, 4°C</i>	<i>Abnova</i>
Sekundär-AK	Isotyp	Klon	Verdünnung in DAKOS3022	Inkubation	Firma
<i>Goat-Anti-Rabbit Cy2</i>	<i>IgG</i>	<i>Polyklonal</i>	<i>1:100</i>	<i>30 min, RT</i>	<i>Dianova</i>

Abb. 13: Tabelle der verwendeten Antikörper, Syncytin-Expression.

Die Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben auf Chamberslides ausgesät und kultiviert. In Folge wurden die Zellen 10 min mit Aceton fixiert. Anschließend wurden die Chamberslides mit PBS 3 × für 2 min gespült. Um eine unspezifische Färbung zu verhindern, wurden die Chamberslides mit Ultra V Block für 15 min inkubiert und anschließend entfernt.

Der erste Primärantikörper Syncytin wurde 1:20 verdünnt und auf die Präparate aufgetragen. Die Inkubierung erfolgte über Nacht (ca. 16 h) im Kühlschrank (ca. 4°C). Am nächsten Tag wurden die Chamberslides erneut 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Die nächsten Arbeitsschritte sollten möglichst ohne Lichteinwirkung erfolgen, da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind, sonst schnell zerfallen würden.

Der Sekundärantikörper Goat-Anti-Rabbit-IgG mit dem grünen Farbstoff Cy2 markiert wurde erst 1:100 verdünnt. Nach 30 min wurden die Chamberslides 3 × für 2 min mit PBS gespült.

Nachdem die Präparate im Dunkeln getrocknet waren, wurden sie mit Mounting Medium der Fa. Vector, welches DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol) enthält, eingedeckt (siehe Abb. 13).

3.4.3 Auswertung der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Immunfluoreszenzmikroskop (*Axio Vision Zeiss*). durch drei unabhängige Begutachter, darunter die Pathologin Frau PD Dr. Doris Mayer. Mit Hilfe einer digitalen Kamera (*Axiocam, Zeiss*) wurden Abbildungen erstellt.

3.4.3.1 E-Cadherin - Zytokeratin Doppelexpression, Syncytin Expression

Die Intensität der grünen E-Cadherin-, bzw. der Syncytin- Expression wurde anhand der prozentualen Veränderung des exprimierten Zellmembrananteils an der Zellanzahl gemessen. Bei 100% waren alle Zellmembranen positiv, bei 0% gar keine. Der nicht parametrische Wilcoxon Test wurde genutzt, um die Färbeintensität zu vergleichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ beidseitig festgelegt.

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows®.

3.4.3.2 Anti- β -Hydroxysteroiddehydrogenase-Anti-P450-Aromatase Doppelexpression

Die rot gefärbten Zellen, die Anti-P450-Aromatase exprimierten, wurden im gesamten Präparat durch drei unabhängige Begutachter ausgezählt. Es wurde ein Mittelwert gebildet.

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows®.

3.5 PCR

3.5.1 Zellkultivierung für die RNA Isolation

Für diesen Versuchsaufbau wurden in vier T25 ml Flaschen je 1 Million Zellen in je 1,5 ml DMEM Kulturmedium ausgesät. Die Zellen von zwei Flaschen wurden mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 stimuliert. Die Zellen der zwei weiteren Flaschen dienten als Negativ-Kontrolle (nur Zellmedium). Die Zellen wurden bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand abgezogen.

3.5.2 RNA-Isolation

Direkt danach wurden die Zellen für eine RNA-Isolation in 3 ml PBS resuspendiert.

Für die Isolation der mRNA wurde ein KIT der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zur Zelllyse wurden in einem ersten Schritt 350 µl RA1 Lysis Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol auf das Zellpellet pipettiert und anschließend vermischt. Zur Filtration des Lysats wurde diese Lösung auf einen Nucleo Spin Filter, der vorher in ein Sammelgefäß gesetzt wurde, pipettiert und 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Der Nucleo Spin Filter wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl 70% Ethanol auf das Lysat gegeben und gut vermischt. Zur RNA Bindung wurde das Lysat auf eine Nucleo Spin RNA II Säule, die vorher in ein Eppendorf Tube platziert worden war, pipettiert und 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Zur Entsalzung der Silica Membran wurden anschließend 350 µl Membran Desalting Buffer auf die Säule pipettiert und 1 min bei 11000 g zentrifugiert.

Für den nächsten Schritt wurde 90 µl DNase Inkubationspuffer mit 5 µl DNase in einem RNase-freiem Tube gemischt. Diese Mischung wurde dann auf den Filter pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung der genomischen DNA wurden 200 µl RA2 Waschpuffer auf den Filter gegeben und 30 sec bei 11000 g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in eine neues Sammelgefäß platziert. Eine erneute Waschung erfolgte durch Zugabe von 600 µl RA3 Waschpuffer auf den Filter und Zentrifugation bei 11000 g für 30 Sekunden. Nach der Entsorgung des Durchlaufs wurden 250 µl des RA3 Waschpuffers auf die Nucleo Spin RNA II Säule gegeben und 2 min bei 11000 g zentrifugiert. Der Filter wurde nach diesem Schritt in ein neues nukleasefreies 1,5 ml Mikrozentrifugierungsröhrchen gesetzt und nach Zugabe von 60 µl RNase freies Wasser 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Im Anschluss an diesen letzten Schritt wurde die RNA-Suspension sofort bei –80°C eingefroren (siehe Abb. 14).

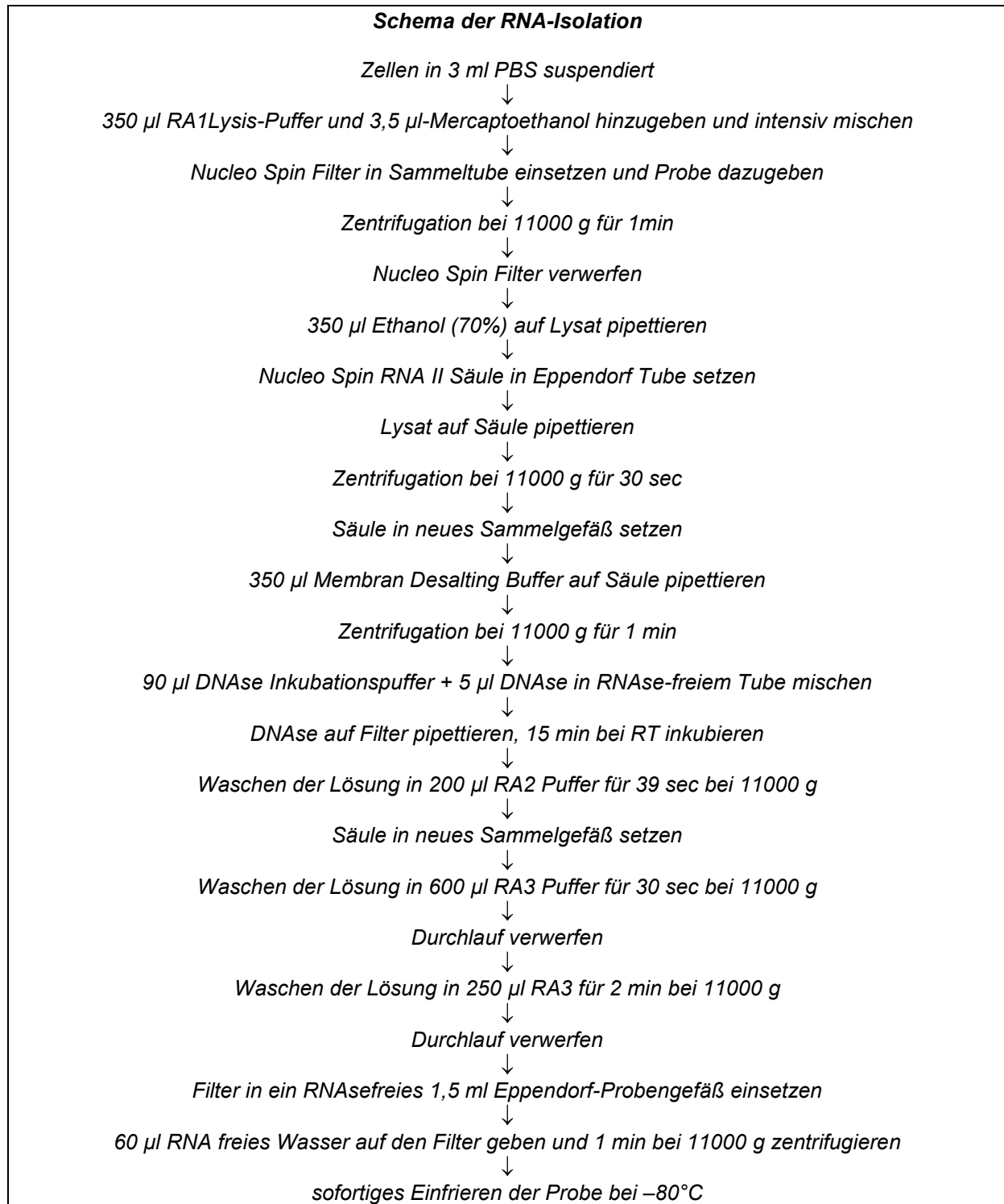


Abb. 14: Schema der RNA-Isolation.

3.5.3 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde sofort mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein cDNA Synthese KIT der Firma Applied Biosystems verwendet, das bei -20°C gelagert wurde.

Zunächst wurden 10 × RT Puffer, 10 × RT Random Primer, 25 × dNTP Mix und RNase Inhibitor kurz angetaut und auf Eis gestellt. 3,2 µl Nuklease freies Wasser und 2 µl 10 RT Puffer wurden in einem 0,5 ml sterilen PCR-Reaktionsgefäß vermischt.

Nacheinander wurden folgende Reagenzien dazugegeben: 0,8 µl 25 × dNTP Mix, 2 µl 10 × RT Random Primer und 1 µl RNase-Inhibitor.

Anschließend wurden 10 µl der RNA-Probe kurz angetaut und zu der Mischung gegeben. Zuletzt wurde 1 µl Reverse Transkriptase kurz angetaut und dazugegeben. Die folgenden Inkubationen wurden im Eppendorf Mastercycler durchgeführt: 10 min bei 25°C, anschließend 120 min bei 37°C und zuletzt 5 sec bei 85°C, um die Lösung zu denaturieren. Die Lösung wurde dann 5 min bei 4°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C (siehe Abb. 15).

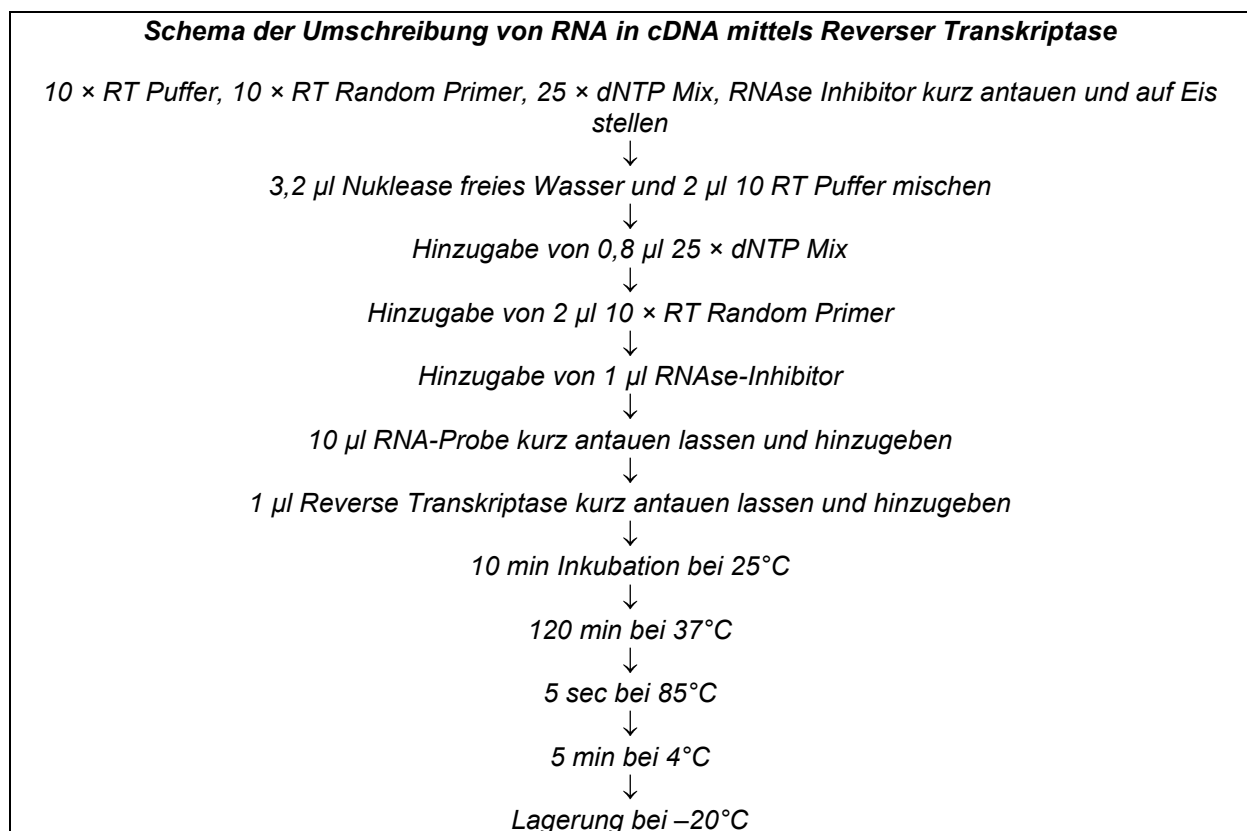


Abb. 15: Schema der Umschreibung von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase.

3.5.4 Durchführung der PCR

3.5.4.1 Real-time PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion erfolgt eine *in-vitro* Vervielfältigung eines bestimmten spezifischen DNA-Abschnitts.

Bei der Real-Time PCR geht es um den quantitativen Nachweis einer bestimmten mRNA Sequenz. Im Gegensatz zur konventionellen PCR erfolgt die Messung der Anzahl der entstandenen Kopien direkt nach jedem Zyklus. Die Real-Time PCR erlaubt die Quantifizierung der DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Messung kann wie hier mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe erfolgen. Diese lagern sich an doppelsträngige DNA an und ändern dabei ihr Emissionsmaximum. Die Zunahme der DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Es wird eine Mindestmenge an DNA-Molekülen benötigt, bevor ein Signal detektiert wird. Es kommt erst zu einer exponentiellen Phase des Signals, dann zu einer Übergangsphase und schließlich zu einem Fluoreszenzmaximum. Als Signalgrenzwert (threshold) gilt der Fluoreszenz-Wert, der der 10-fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchzyklus CT (cycle threshold) definiert. Die Quantifizierung erfolgt also im quasi linearen Teil der exponentiellen Kurve. Am Ende eines Laufs wird mit Hilfe der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann.

Für 1 µl cDNA musste folgende Mischung hergestellt werden:

- 1 µl Assay Mix (20 ×): enthält 2 Primer (komplementäre Oligonukleotide zum sequenzierten cDNA Abschnitt, legen auf den Einzelsträngen der cDNA den Startpunkt fest, wodurch der zu vervielfältigende Bereich von beiden Seiten begrenzt wird, diese Primer überspannen Introns und sind somit cDNA spezifisch) und die TaqMan Sonde (es wurde mit einer TaqMan Sonde gearbeitet, die nach dem „Förster resonance energy transfer“ (= FRET) - Prozess funktioniert. Die Sonde ist an einem Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) und am anderen Ende mit einem Quencher-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Beim FRET-Prinzip wird die Photonenenergie

strahlungsfrei, im Wesentlichen durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung, von dem durch eine Lichtquelle angeregten Fluorophor auf den Quencher übertragen, wenn der Abstand zwischen beiden nicht mehr als 10^{-10} nm beträgt. Während der Annealing Phase lagert sich die TaqMan Sonde an den durch die Denaturierungsphase der PCR einfach vorliegenden DNA Strang an. Die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase baut das 5'-Ende der Sonde ab und führt zur Freisetzung des Reporters. Dadurch entfernen sich Quencher und Reporter. Die Fluoreszenz des Reporters wird nicht mehr auf den Quencher übertragen und kann gemessen werden. Diese Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt (MCPerson M. J. & Møller S. G. 2000. PCR. Oxford: BIOS Scientific) (siehe Abb. 16).

- **10 µl** TaqMan®PCR Master Mix (2 ×) (enthält hitzestabile DNA TaqPolymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, Elongation des Einzelstrangs), Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP: Bausteine für den DNA Strang), Mg-Ionen (grundlegend für die DNA Polymerase Funktion) und Puffersubstanzen.
- **8 µl** steriles Wasser (um die Flüssigkeitsmenge auf **20 µl** zu bringen)

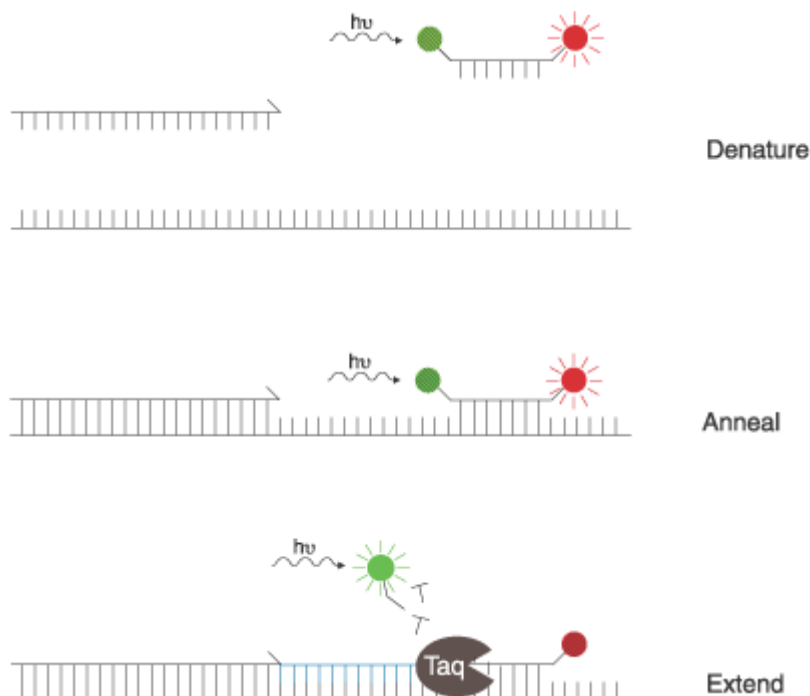


Abb. 16: FRET-TaqMan Sonden Prinzip, Department of Biology, Davidson College, Davidson, 2003.

Für die Real Time RT-PCR wurden kommerziell verfügbare Kits für die Bestimmung der Gen Expression für E-Cadherin (Hs00170423_m1, Applied Biosystems), Ki67

(Hs00606991_m1, Applied Biosystems) und GAPDH (Hs99999905_m1, Applied Biosystems) hergenommen. Als house-keeping Gene wurden GAPDH und β -Aktin getestet. Als endogene Amplifikations-Kontrolle diente die Expression von GAPDH, da sich β -Aktin in den BeWo Zellen als nicht geeignet herausstellte.

Für folgende Assays (GAPDH, E-Cadherin und Ki67) wurden Mastermixe mit dem jeweils entsprechenden Assay Mix in 14facher Menge hergestellt, wie in folgender Tabelle beschrieben (siehe Abb. 17). Auf je 19 μ l Mastermix erfolgt später die Zugabe von 1 μ l entsprechender c-DNA

	1 Reaktion	14 Reaktionen
<i>Assay Mix (20 \times)</i>	<i>1 μl</i>	<i>14 μl</i>
<i>TaqMan®PCR Master Mix (2 \times)</i>	<i>10 μl</i>	<i>140 μl</i>
<i>steriles Wasser</i>	<i>8 μl</i>	<i>112 μl</i>
<i>Summe</i>	<i>19 μl</i>	<i>266 μl</i>

Abb. 17: Mastermix Berechnungstabelle.

Unter einer sterilen Werkbank wurden in einer PCR 96well Platte in die erste Reihe (A1 bis A12) sowie in H1 jeweils 19 μ l des GAPDH Mastermix, in die zweite Reihe (B1 bis B12) sowie in H2 jeweils 19 μ l des E-Cadherin Mastermix, und die dritte Reihe (C1 bis C12) sowie in H3 jeweils 19 μ l des Ki67 Mastermix.

In A1 bis A3, B1 bis B3 und C1 bis C3 wurde jeweils 1 μ l der ersten cDNA Kontrolle, in A4 bis A6, B4 bis B6 und C4 bis C6 wurde jeweils 1 μ l der zweiten cDNA Kontrolle, in A7 bis A9, B7 bis B9 und C7 bis C9 wurde jeweils 1 μ l der ersten Gal-1 stimulierten cDNA, in A10 bis A12, B10 bis B12 und C10 bis C12 wurde jeweils 1 μ l der zweiten Gal-1 stimulierten cDNA in pipettiert.

In H1 bis H3 wurde jeweils 1 μ l Wasser gegeben (siehe Abb. 18).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ko1 GAPDH	Ko1 GAPDH	Ko1 GAPDH	Ko2 GAPDH	Ko2 GAPDH	Ko2 GAPDH	G1 GAPDH	G1 GAPDH	G1 GAPDH	G2 GAPDH	G2 GAPDH	G2 GAPDH
B	Ko1 Ecad	Ko1 Ecad	Ko1 Ecad	Ko2 Ecad	Ko2 Ecad	Ko2 Ecad	G1 Ecad	G1 Ecad	G1 Ecad	G2 Ecad	G2 Ecad	G2 Ecad
C	Ko1 Ki67	Ko1 Ki67	Ko1 Ki67	Ko2 Ki67	Ko2 Ki67	Ko2 Ki67	G1 Ki67	G1 Ki67	G1 Ki67	G2 Ki67	G2 Ki67	G2 Ki67
D												
E												
F												
G												
H	H2O GAPDH	H2O Ecad	H2O Ki67									

Abb. 18: 96well Platte: Ko1 = Kontrolle1, Ko2 = Kontrolle2, G1 = mit Gal-1 stimulierte Zellen1, G2 = mit Gal-1 stimulierte Zellen2, GAPDH = GAPDH Primer, Ecad = E-Cadherin Primer, Ki67 = Ki67 Primer.

Die 96well Platte wurde im nächsten Schritt mit einer Optic cap, einer speziellen optisch klaren Folie, luftdicht und blasenfrei mit Hilfe des Cap installing tools verschlossen, in das 7500 Fast RealTime PCR System Gerät platziert und mit Hilfe der Sequence Detection Software v1.3.1 7500 Fast System gemäß folgendem Temperatur-Zeit Programm inkubiert:

Im 7500 Fast RealTime PCR System Gerät wurde der DNA-Doppelstrang zunächst auf 95°C für 20 sec erhitzt und in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Der folgende Zyklus wurde 40mal durchgeführt: 3 sec 95°C, 30 sec 60°C (siehe Abb. 19). Die Primer konnten sich nun an die Einzelstränge anlagern (primer annealing). Die komplementären DNA-Abschnitte wurden durch die DNA-Polymerase gebildet: sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers (Elongation).

Schema der PCR-Zyklen:

1 Zyklus: 95°C für 20 sec
40 Zyklen: 3 sec 95°C, 30 sec 60°C
Hold: 25°C

Abb. 19: Schema der PCR-Zyklen.

3.5.4.2 Auswertung der Real-Time-PCR

Der CT-Wert (Threshold Cycle, "Schwellenwert-Zyklus") definiert den Zyklus, in dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt.

Berechnung (nach der delta-delta CT-Methode) der relativen Quantifizierung:
die CT-Werte werden subtrahiert (ΔCT), die beiden ΔCT -Werte der einzelnen Proben (Negativ-Kontrollen oder mit Gal-1 stimuliert) subtrahiert ($\Delta - \Delta CT$) und in folgende

Gleichung eingesetzt:

$$n\text{-fache Expression} = 2^{-(\Delta - \Delta CT)}$$

3.6 RayBio®Phosphorylation Antibody Array I

3.6.1 Zellkultivierung für den RTK Kit

Für diesen Versuchsaufbau wurden in zwei T175 je 40 Millionen in je 15 ml DMEM Kulturmedium ausgesät. Die Zellen der einen Flasche wurden mit 60 µg/ml Gal-1 stimuliert, die Zellen der anderen Flasche dienten als Negativ-Kontrolle (nur Zellmedium). Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurde der Überstand abgezogen.

Das RayBio®Phosphorylation Antibody Array I ist eine schnelle und sensitive Methode, um simultan multiple Proteinphosphorylierungen zu detektieren. Es kann die Aktivierung von wichtigen biologischen Signalwegen aufzeigen. Somit kann der relative Grad der Phosphorylierung von 71 unterschiedlichen humanen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) in Zelllysaten simultan identifiziert werden.

Stimulierte und unstimulierte (Negativ-Kontrolle, nur Zellmedium) Zelllysate werden auf die Antikörpermembran aufgetragen. Diese werden dann gewaschen. Mithilfe von biotinyliertem (mit Biotin markiertem) Anti-Phosphotyrosin-Antikörper werden die phosphorylierten Tyrosine an aktivierten Rezeptoren detektiert. Nach der Inkubation mit HRP-Streptavidin werden die Signale über den Chemilumineszenzweg visualisiert (Zur Avidin-Biotin-Methode siehe 3.3.2) (siehe Abb. 20).

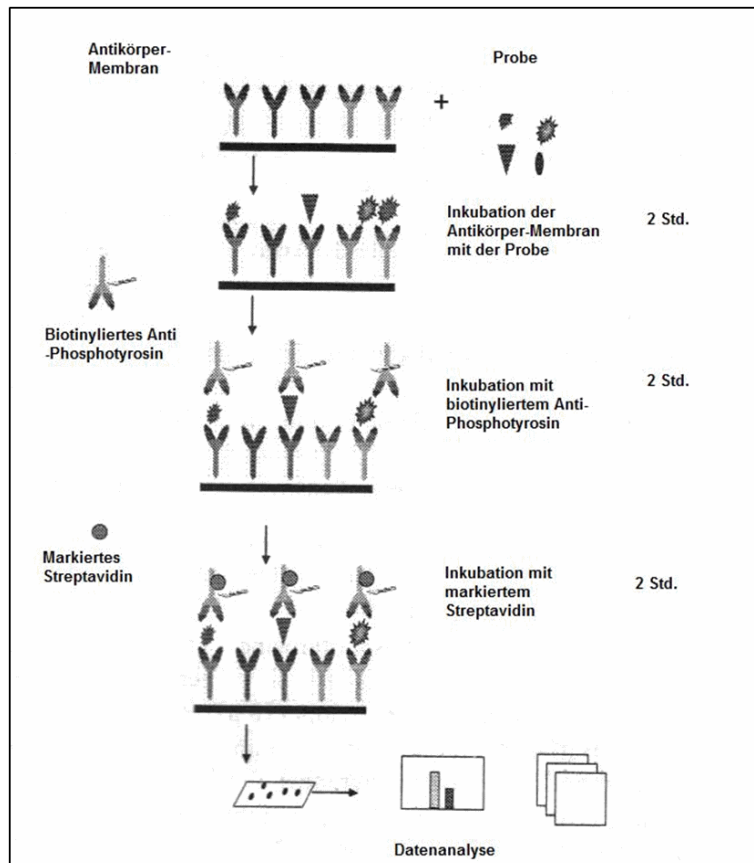


Abb. 20: RayBio® Phosphorylation Antibody Array I, User Manual, 2004 RayBiotech, Inc.

3.6.2 Durchführung des RayBio® Phosphorylation Antibody Array I

3.6.2.1 Erstellung des Lysats

Die Zellen wurden wie unter 3.6.1 beschrieben stimuliert und isoliert. Direkt danach wurden die mit Gal-1 stimulierten (Konzentration: 60 µg/ml) sowie die unstimulierten (Negativ-Kontrolle, nur Zellmedium) Zellen zweimal in 2 ml PBS resuspendiert.

Das 2 × Zell Lysispuffer wurde in einem 1:2 Verhältnis mit Aqua dest. verdünnt (= 1 × Zell Lysispuffer).

Das Gefäß mit Protease Inhibitor wurde kurz abzentrifugiert und 60 µl des 1 × Lysispuffer dazugegeben (= 100 × Protease Inhibitor Cocktail Konzentrat).

Das Gefäß mit Phosphatase Inhibitor wurde ebenfalls kurz abzentrifugiert und 180 µl des 1 × Lysispuffer dazugegeben (= 25 × Phosphatase Inhibitor Cocktail Konzentrat).

In zwei verschiedenen 2 ml Eppendorf Gefäßen wurden jeweils 1,9 ml des 1 × Zell Lysispuffer mit 20 µl des 100 × Protease Inhibitor Cocktail Konzentrats und 80 µl des 100 × Phosphatase Inhibitor Cocktail Konzentrats vermischt.

Die beiden 2 ml Mischungen wurden anschließend auf die jeweiligen Zellpellets (Kontrolle und stimulierte Probe) pipettiert und in 2 ml Eppendorf Gefäße überführt. Die Lysate wurden abgezogen und bei 2-8°C für 30 Minuten auf einem Rüttler gemixt. Danach wurden die Lysate bei 14000 g für 10 Minuten abzentrifugiert.

3.6.2.2 Durchführung des Bradford Tests

Das Bradfordreagenz musste zunächst in einem 1:5 Verhältnis mit Aqua dest. verdünnt werden.

Die Zellproben wurden ebenfalls mit Aqua dest. verdünnt und zwar in einem 1:10 Verhältnis.

Für die Standardkurve musste nun eine Verdünnungsreihe durchgeführt werden:

1000 µg/ml = 735 µl Standard (unverdünnt) + 265 µl Aqua dest.

800 µg/ml = 400 µl Standardlösung (1000 µg/ml) + 100 µl Aqua dest.

400 µg/ml = 200 µl Standardlösung (800 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

200 µg/ml = 200 µl Standardlösung (400 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

100 µg/ml = 200 µl Standardlösung (200 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

50 µg/ml = 200 µl Standardlösung (100 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

Für den Nullwert wurden 1ml Bradfordreagenz mit 20 µl Aqua dest. vermischt.

20 µl der entsprechenden Standardlösungen und 20 µl der Proben wurden jeweils mit 1 ml Bradfordreagenz vermischt.

Anschließend wurden je 1ml der angesetzten Röhrchen in eine Küvette überführt.

Das Photometer wurde auf 595 nm eingestellt und eine lineare Regression als Aufzeichnungsart gewählt.

Die Küvette mit dem Nullwert wurde im nächsten Schritt in das Gerät platziert. Die erste Messung wurde durchgeführt. Anschließend wurde die Küvette mit dem ersten Standard 50 µg/ml eingestellt und erneut gemessen. Um eine Standardkurve zu erstellen, wurde mit den weiteren Standards in aufsteigenden Konzentrationen genauso verfahren. Als letztes wurden die Küvetten mit den Proben einzeln eingestellt und gemessen. Die Proteinkonzentrationen der zwei Proben wurden nun abgelesen.

Die Proben wurden anschließend wie in 4.4.1 beschrieben in Blockingpuffer auf eine Konzentration von 1000 µg/ml verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 1,2 ml gebracht und weiterverarbeitet.

3.6.2.3 Phosphorylierungsassay

Für die weiteren Versuche mussten zunächst folgende Vorbereitungen getroffen werden:

25 ml des 20fachen Waschpuffer Konzentrats wurden in 475 ml Aqua dest. verdünnt (= 1 × *Waschpuffer*).

Das Gefäß mit Biotinyliertem Anti-Phosphotyrosin wurde kurz abzentrifugiert und 100 µl des Blockierungspuffers hinzugegeben. Der gesamte Inhalt wurde anschließend in ein Gefäß überführt, das 2,5 ml Blockingpuffer enthielt (= 1 × *biotinylierter Anti-Phosphotyrosin*).

Das Gefäß mit HRP-Streptavidin Konzentrat wurde ebenfalls kurz abzentrifugiert. 5 µl HRP-Streptavidin Konzentrat wurden mit 5 ml Blockingpuffer vermischt (= 1 × *HRP-konjugiertes-Streptavidin*).

Zwei Membranen wurden anschließend in das 8-Well Gefäß mit der Markierung (-) nach oben eingelegt. Um die Membran zu blocken wurden jeweils 1 ml Blockingpuffer auf die Membranen pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde der Blockingpuffer dekantiert, je 1,2 ml der Proben (die Negativ-Kontrolle (nur Zellmedium) und mit Gal-1 stimulierte Probe) auf die jeweiligen Membranen aufgetragen und zwei Stunden bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die Proben dekantiert und 3 × 3 Minuten mit 2 ml 1 × Waschpuffer I bei RT auf dem Rüttler gewaschen.

Die Membranen wurden dann vorsichtig entnommen und jeweils in eine Petrischale mit 20 ml 1 × Waschpuffer I gelegt und 3 × 5 Minuten auf dem Rüttler gewaschen. Währenddessen wurde das 8-Well Gefäß mit Aqua dest. gewaschen und getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Membranen jeweils in eine Petrischale mit 20ml 1 × Waschpuffer II gelegt und erneut 3 × 5 Minuten auf dem Rüttler gewaschen. Anschließend wurden die Membranen zurück in das 8-Well Gefäß gelegt.

Jetzt wurden jeweils 1,2 ml des verdünnten biotinylierten Anti-Phosphotyrosin auf die Membranen gegeben und zwei Stunden bei RT inkubiert um phosphorylierte Tyrosine auf aktivierten Rezeptoren zu detektieren.

Die Membranen wurden im nächsten Schritt nach dem oben beschriebenen Prozedere gewaschen. Jeweils 1,5 ml des 1 × HRP-konjugierten Streptavidin wurden dann auf die Membranen pipettiert bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen erneut nach dem oben beschriebenen Prozedere gewaschen.

Für jede Membran wurde folgende Mischung gefertigt: 250 ml Detektionspuffer A und 250 µl Detektionspuffer B. Diese wurde dann auf die jeweilige Membran pipettiert.

Das 8-Well Gefäß wurde anschließend in das Gel-Dokumentations-Gerät von Bio-Rad platziert.

Die Detektion des Signals erfolgte auf dem Chemilumineszenz-Weg.

3.6.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Zuordnung der Phosphorylierung der unterschiedlichen Rezeptor-Tyrosinkinasen erfolgte anhand folgender Tabelle:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS1	POS1	POS2	POS2	POS3	POS3	ABL1	ABL1	ACK1	ACK1	AKL	AKL
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Axl	Axl	Blk	Blk	BMX	BMX	Btk	Btk
3	Csk	Csk	Dtk	Dtk	EGFR	EGFR	EphA1	EphA1	EphA2	EphA2	EphA3	EphA3
4	EphA4	EphA4	EphA5	EphA5	EphA6	EphA6	EphA7	EphA7	EphA8	EphA8	EphB1	EphB1
5	EphB2	EphB2	EphB3	EphB3	EphB4	EphB4	EphB6	EphB6	ErbB2	ErbB2	ErbB3	ErbB3
6	ErbB4	ErbB4	FAK	FAK	FER	FER	FGFR1	FGFR1	FGFR2	FGFR2	FGFR2	FGFR2
7	Fgr	Fgr	FRK	FRK	Fyn	Fyn	Hck	Hck	HGFR	HGFR	IGF-I R	IGF-I R
8	InsulinR	InsulinR	Itk	Itk	JAK1	JAK1	JAK2	JAK2	JAK3	JAK3	LCK	LCK
9	LTK	LTK	Lyn	Lyn	MATK	MATK	M-CSFR	M-CSFR	MUSK	MUSK	NGFR	NGFR
10	PDGFRα	PDGFRα	PDGFRβ	PDGFRβ	PYK2	PYK2	RET	RET	ROR1	ROR1	ROR2	ROR2
11	ROS	ROS	RYK	RYK	SCFR	SCFR	SRMS	SMRS	SXK	SYK	Tec	Tec
12	Tis-1	Tis-1	Tis-2	Tis-2	TNK1	TNK1	TRKB	TRKB	TXK	TXK	NEG	NEG
13	Tyk2	Tyk2	TYRO10	TYRO10	VEGFR2	VEGFR2	VEGFR3	VEGFR3	ZAP70	ZAP70	POS2	POS2

Abb. 21: Tabelle der 71 RTKs, Phosphorylation Antibody Array.

Die Veränderung der Signalintensität zwischen Kontrolle und der mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten Membran wurde anhand des Programms *Quantity One Version 4.5.2* verglichen und durch den Mittelwert der Positiv-Kontrollen und den Mittelwert des Grundrauschens korrigiert. Der nicht parametrische Wilcoxon Test wurde genutzt, um die Färbeintensität zu vergleichen. Die Signifikanz der Unterschiede wurde bei einem p-Wert von <0,05 beidseitig festgelegt.

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerstatistikprogramms SPSS für Windows®.

4 Ergebnisse

4.1 Immunzytochemie

4.1.1 Positiv- und Negativ-Kontrollen

In Abb. 22 sind die Ergebnisse der Positiv-Kontrollen der einzelnen Antikörper dargestellt: Leptin Positiv-Kontrolle an Plazenta-Gewebe, die E-Cadherin-, β -Catenin- und Ki67 Positiv-Kontrolle an Mamma-Karzinom-Gewebe.

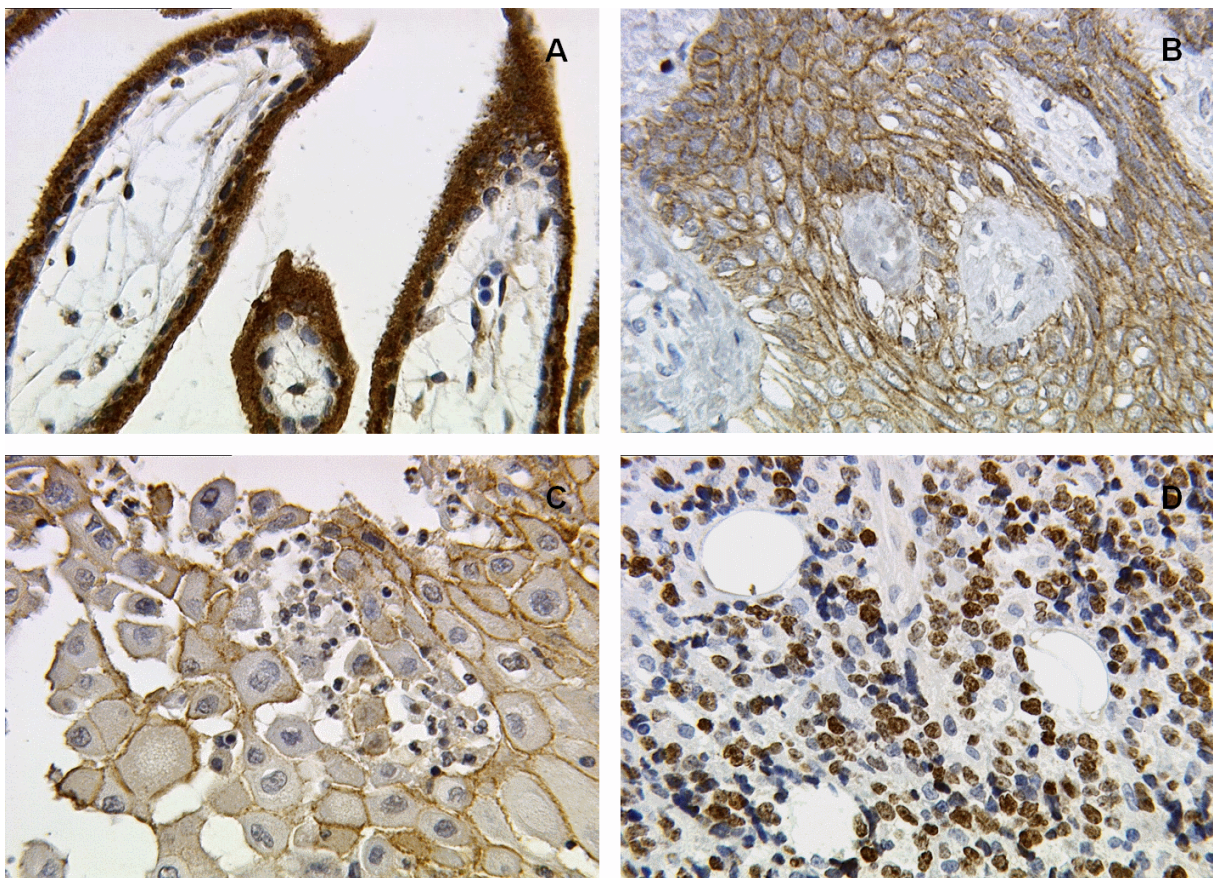


Abb. 22: **A:** Leptin Positiv-Kontrolle an Placenta-Gewebe, **B:** E-Cadherin Positiv-Kontrolle an MammaCa-Gewebe, **C:** Beta-Catenin Positiv-Kontrolle an MammaCa-Gewebe, **D:** Ki67 Positiv-Kontrolle an MammaCa-Gewebe ($\times 20$).

In Abb. 23 sind die Ergebnisse der Negativ-Kontrollen für die Mouse und Sheep Antikörper dargestellt. Dafür wurden die Primärantikörper durch Isotypenkontrollen aus der jeweiligen Spezies ersetzt.

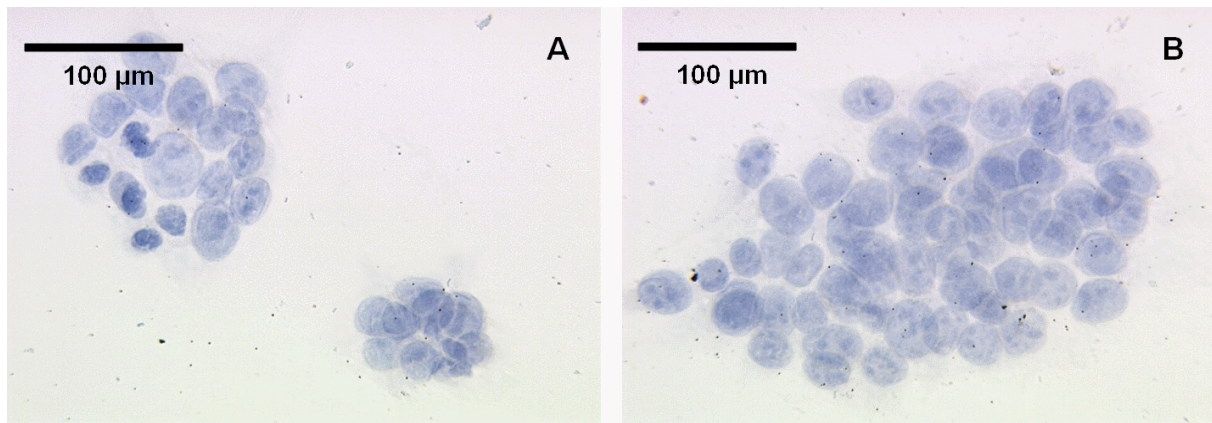


Abb. 23: **A:** Mouse Negativ-Kontrolle an BeWo Zellen, **B:** Sheep Negativ-Kontrolle an BeWo Zellen ($\times 40$).

4.1.2 Ki67 Kernfärbung

Die Intensität der Ki67 Kernfärbung wurde anhand des semiquantitativen IRS-Scores gemessen (siehe 3.3.3.1). Bei der 24 h BeWo Zellkultur zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Ki67 Expression: bei der Kontrolle betrug der MW (Mittelwert) des IRS-Scores 9 (SEM = 0,35), bei den mit 10 µg/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme ($p = 0,025$) auf 6 (SEM = 0,35) im Gegensatz zur Kontrolle, bei den mit 30 µg/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen eine signifikante Abnahme ($p = 0,039$) auf 4 (SEM = 0,41) im Gegensatz zur Kontrolle und bei den mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen eine signifikante Abnahme ($p = 0,041$) auf 3,8 (SEM = 0,41) im Gegensatz zur Kontrolle (siehe Abb. 24 und 25).

Bei der 48 h Kultivierung der BeWo Zellen zeigte sich keine weitere Abnahme der kernständigen Ki67 Färbung.

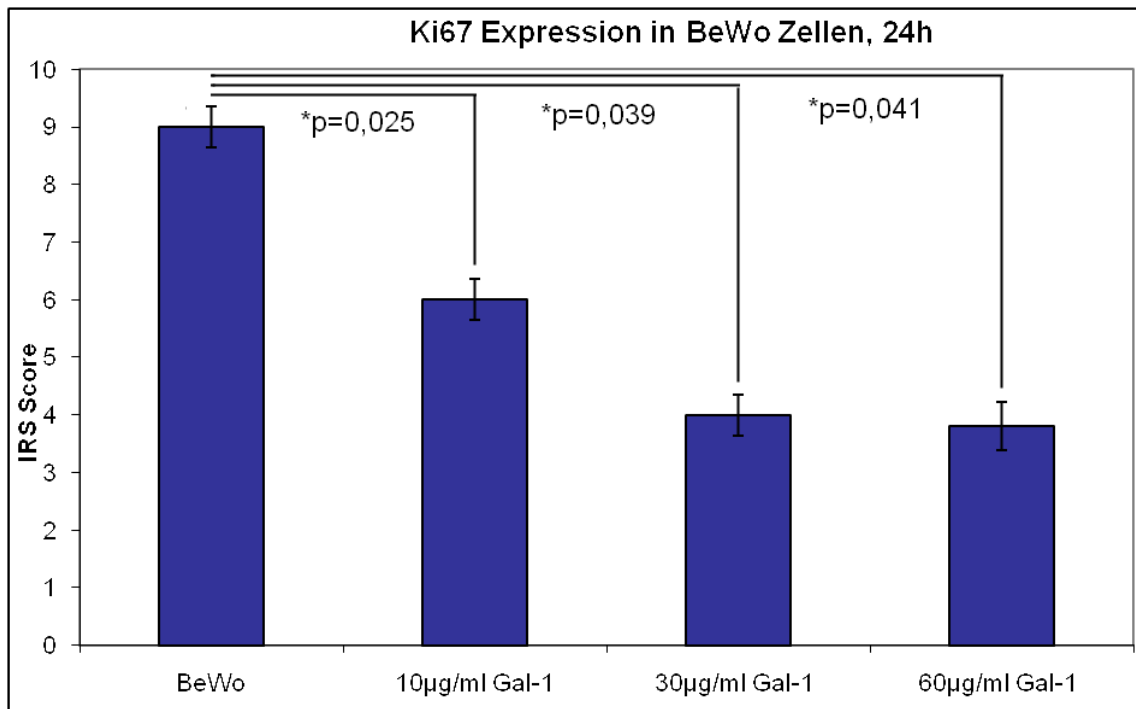


Abb. 24: Ki67 Expression in BeWo Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro: Abnahme der Ki67 Kernfärbung mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

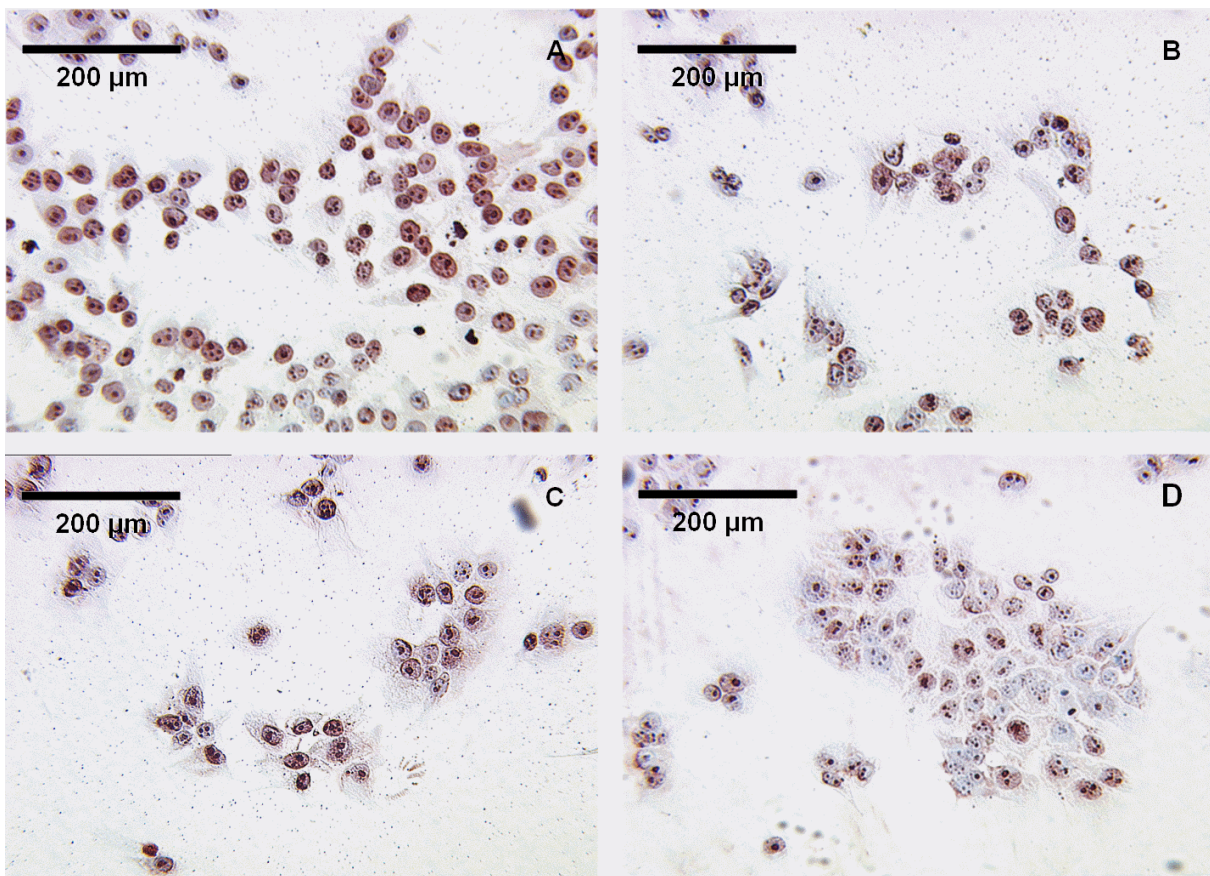


Abb. 25: **A:** Ki67 Expression in BeWo Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro, **B:** Ki67 Expression in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 10 µg/ml Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro, **C:** Ki67 Expression in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 30 µg/ml Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro, **D:** Expression von Ki67 in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 60 µg/ml Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro ($\times 20$).

4.1.3 Leptin Zytosolfärbung

Die Intensität der Leptin Zytosolfärbung wurde anhand des semiquantitativen IRS-Scores gemessen (siehe 3.3.3.1). Bei der 48 h BeWo Zellkultur zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hochregulierung: bei der Kontrolle betrug der Mittelwert (MW) des IRS-Scores 3 (SEM = 0,35), bei den mit 10 µg/ml Gal-1 stimulierten Zellen zeigte sich eine nicht signifikante Zunahme auf 3,2 (SEM = 0,41), bei den 30 µg/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen zeigte sich eine nicht signifikante Zunahme auf 4,2 (SEM = 0,22) im Gegensatz zur Kontrolle und bei den mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen eine signifikante Zunahme ($p = 0,041$) auf 9 (SEM = 0,22) im Gegensatz zur Kontrolle.

Bei der 24 h Zellkultur zeigte sich noch keine Zunahme der Leptin-Färbung (siehe Abb. 26 und 27).

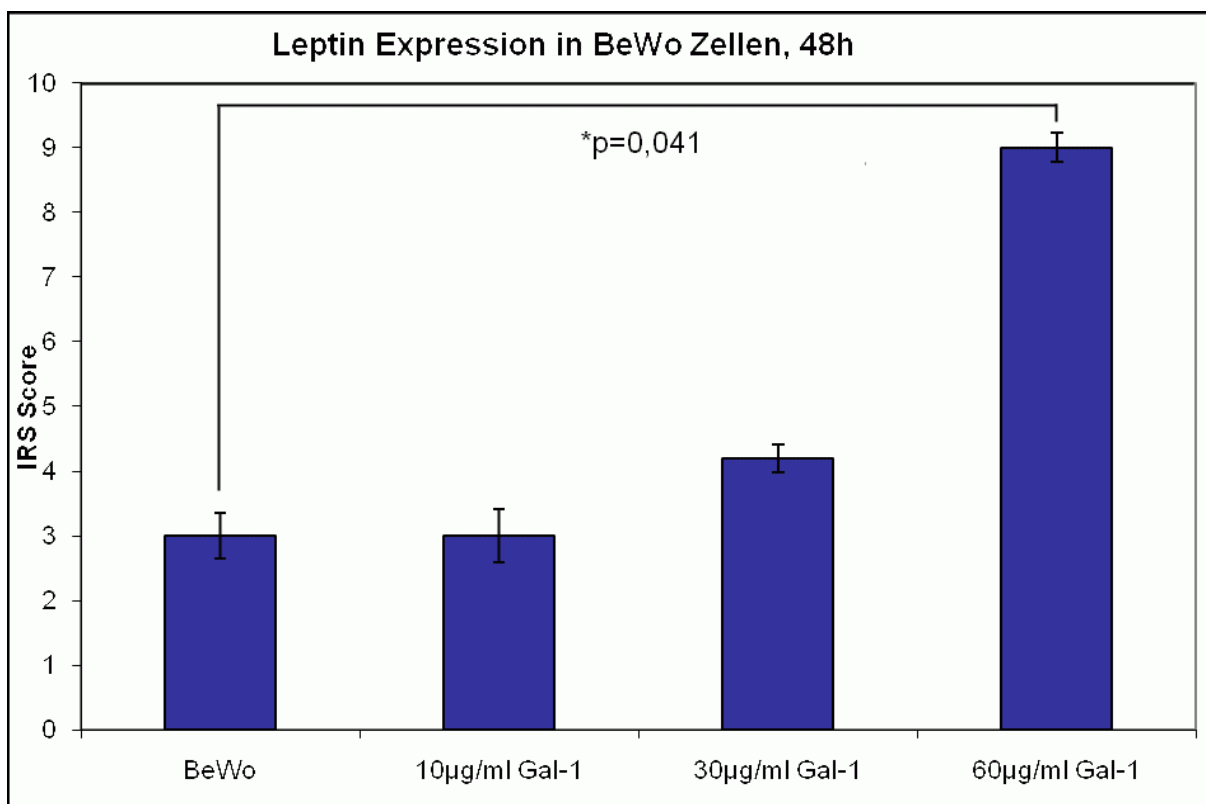


Abb. 26: Leptin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung *in-vitro*: Zunahme der Zytosolfärbung mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

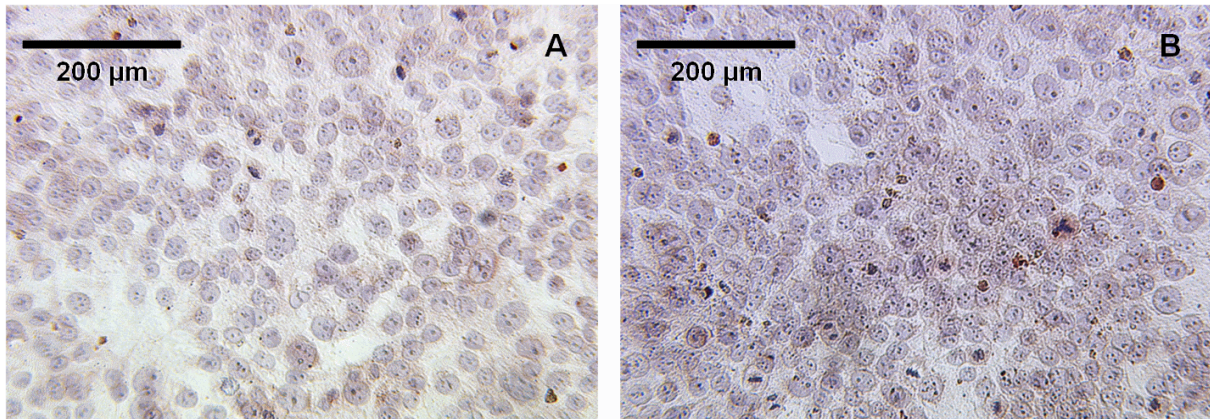


Abb. 27: **A:** *Leptin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro*, **B:** *Leptin Expression in BeWo Zellen nach Stimulierung mit 60 µg/ml Gal-1, 48 h Kultivierung in-vitro* ($\times 20$).

4.1.4 β -Catenin Membranfärbung

Die Intensität der β -Catenin Färbung wurde anhand der prozentualen Veränderung des gefärbten Zellmembrananteils an der Zellanzahl gemessen (siehe 3.3.3.2): es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme. Bei der Kontrolle der 24 h Zellkultur betrug der Mittelwert (MW) 80% (SEM = 3,53), bei den mit 10 µg/ml Gal-1 stimulierten Zellen zeigte sich eine signifikante Abnahme ($p = 0,042$) auf 54% (MW) (SEM = 5,7) im Gegensatz zur Kontrolle, bei der Stimulierung mit 30 µg/ml Gal-1 eine signifikante Abnahme ($p = 0,042$) auf 34% (MW) (SEM = 5,7) und bei der Stimulierung mit 60 µg/ml Gal-1 eine signifikante Abnahme ($p = 0,041$) auf 20% (MW) (SEM = 4,18). Bei der 48 h Kultivierung zeigte sich keine weitere Abnahme der β -Catenin Membranfärbung (siehe Abb. 28 und 29).

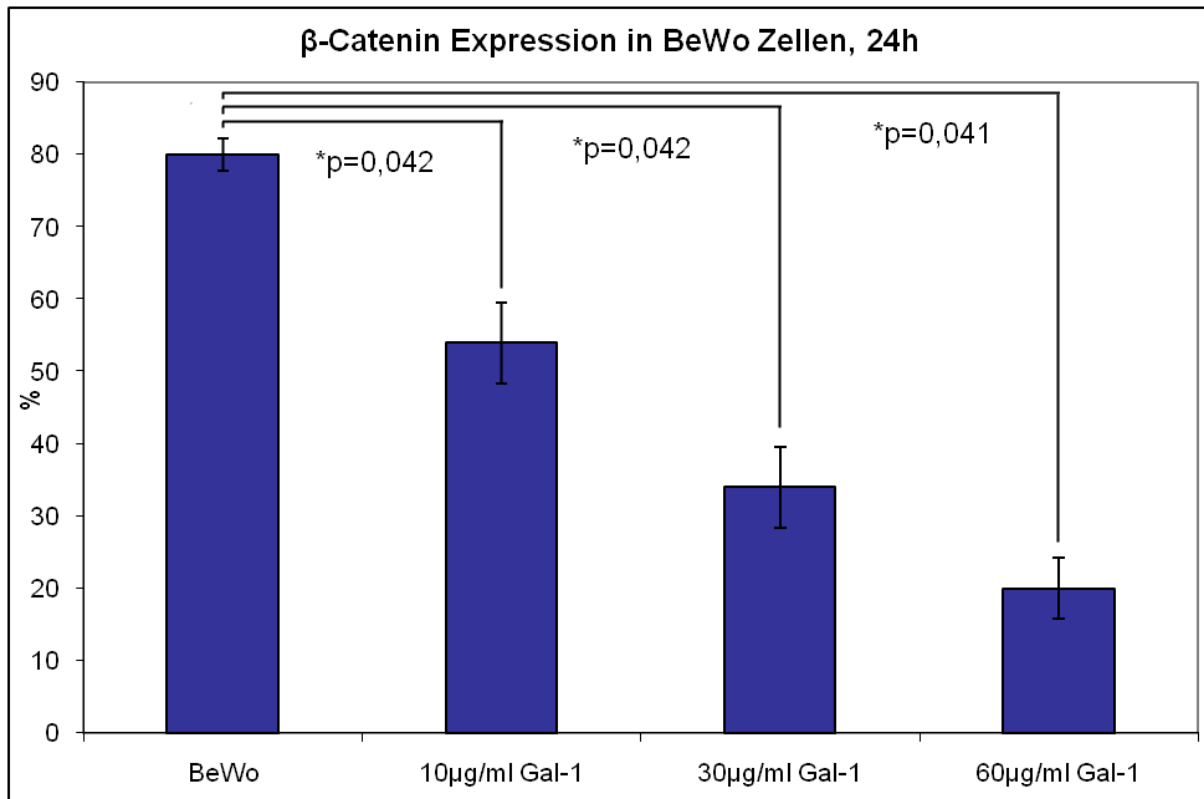


Abb. 28: β -Catenin Expression in BeWo Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro: Abnahme der Membranfärbung mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

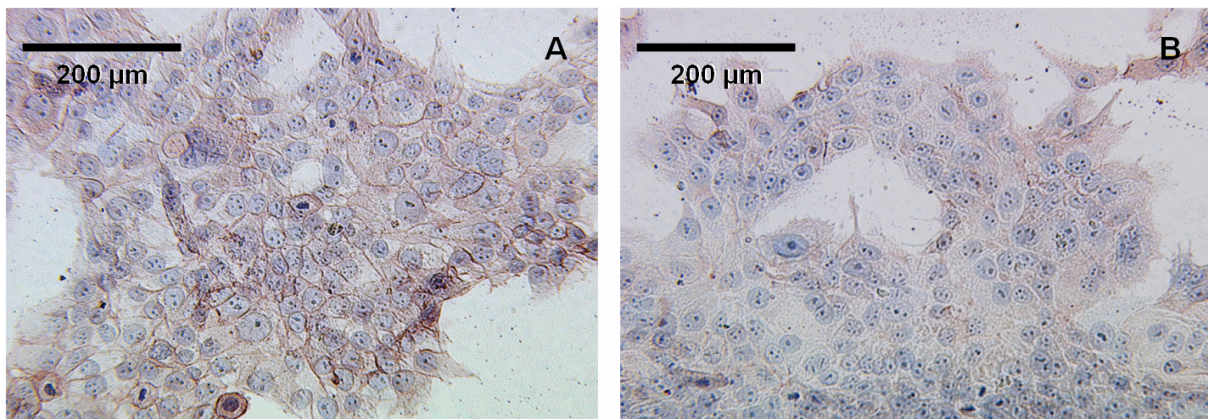


Abb. 29: β -Catenin Expression in BeWo-Zellen, 24 h Kultivierung in-vitro (A), β -Catenin Expression in BeWo-Zellen nach Stimulierung mit 60 µg/ml rek. Gal-1, 24 h Kultivierung in-vitro (B) ($\times 20$).

4.2 Immunfluoreszenz

4.2.1 E-Cadherin-Zytokeratin Doppelexpression

Die Intensität der E-Cadherin Expression wurde anhand der prozentualen Veränderung des positiven Zellmembrananteils an der Zellanzahl gemessen (siehe 3.4.3.1).

Die E-Cadherin Expression zeigte eine signifikante Abnahme von 70 % (SEM = 4,18) (in den unstimulierten Zellen) auf 30 % (SEM = 4,18) in der mit plazentarem 60 µg/ml Gal-1 stimulierten 48 h BeWo Zellkultur ($p = 0,025$) und auf 33 % (SEM = 4,47) in der mit rekombinanten 60 µg/ml Gal-1 stimulierten 48 h BeWo Zellkultur ($p = 0,042$). Zusätzlich zeigte die E-cadherin Expression eine signifikante Abnahme von 70 % auf 33 % (SEM = 4,47) in der mit 60 µg/ml Forskolin stimulierten 48 h BeWo Zellkultur ($p = 0,025$) (siehe Abb. 30 und 31).

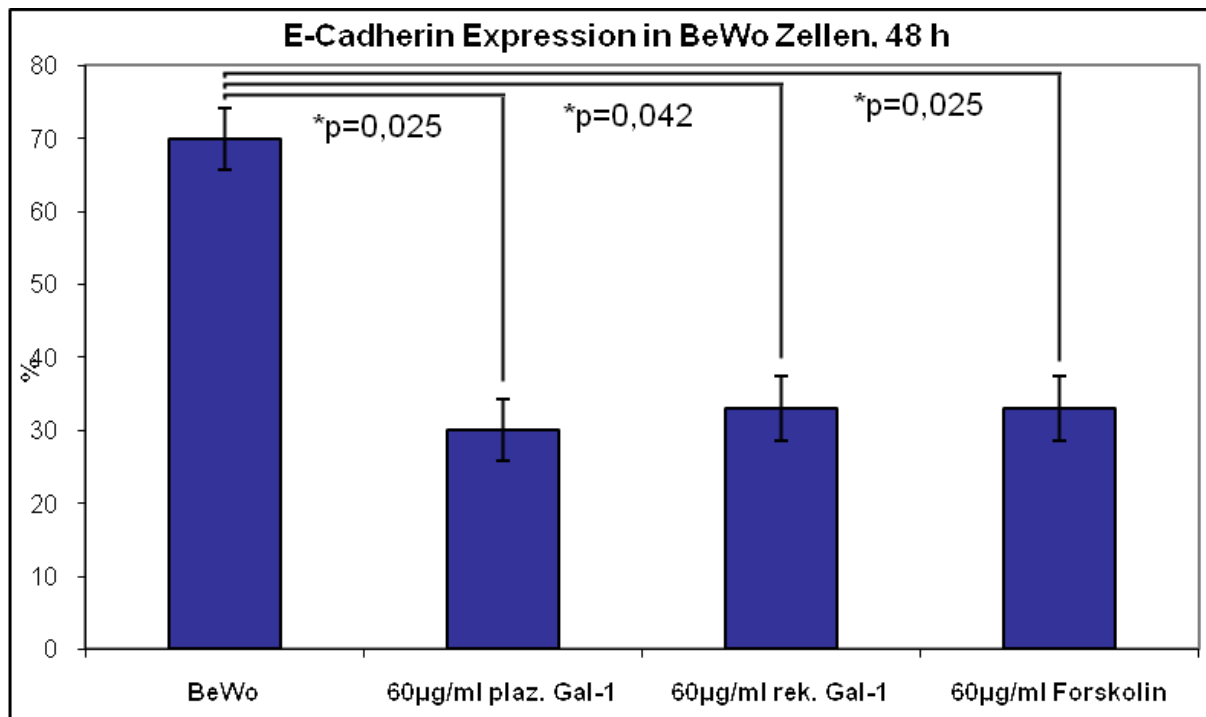


Abb. 30: E-Cadherin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro. Abnahme der Expression in den mit Gal-1 und Forskolin stimulierten Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

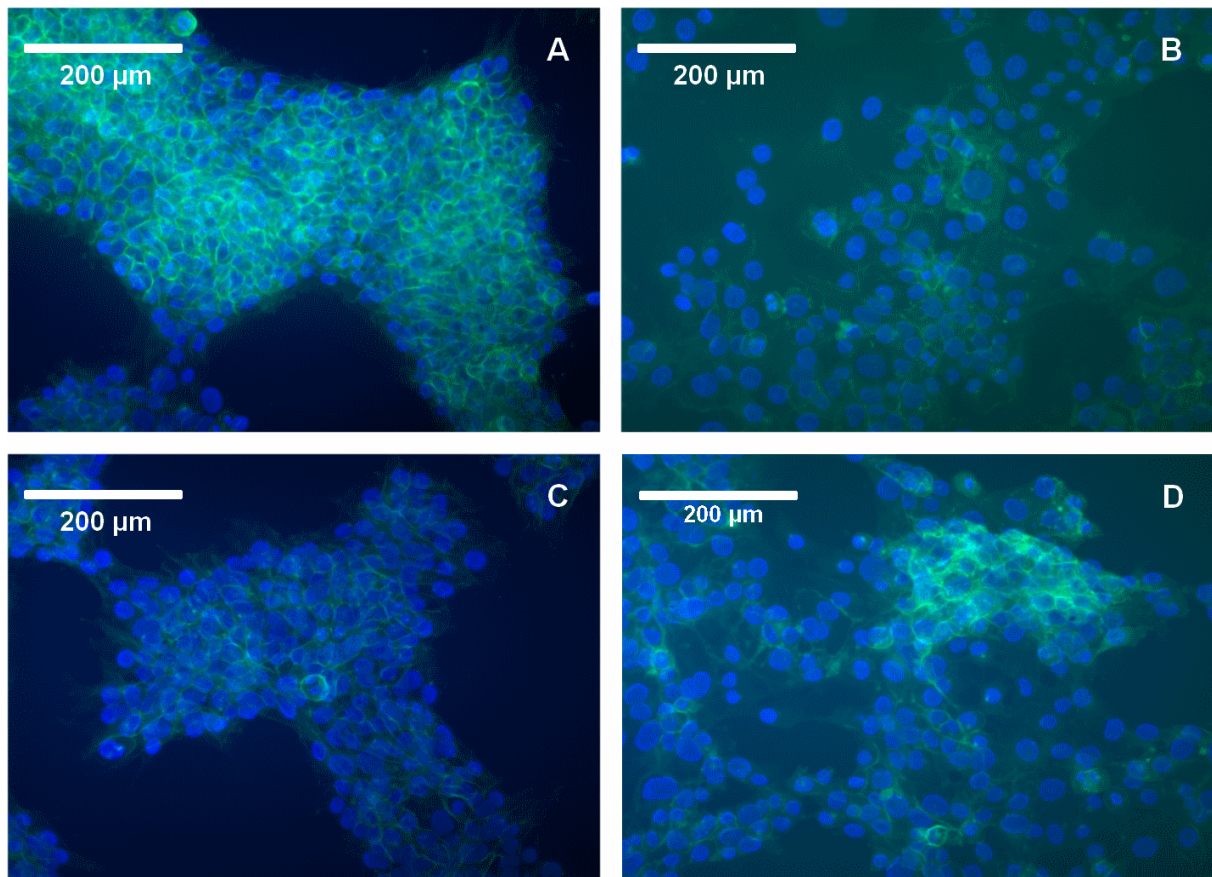


Abb. 31: **A:** E-Cadherin an unstim. BeWo Zellen (Kontrolle), **B:** E-Cadherin an BeWo Zellen mit 60 µg/ml plac. Gal-1 stim., **C:** E-Cadherin an BeWo Zellen mit 60 µg/ml rek. Gal-1 stim., **D:** E-Cadherin an BeWo Zellen mit forskolin stim., 48 h in-vitro (×20).

4.2.2 Syncytin Expression

Die Intensität der Syncytin Expression wurde anhand der prozentualen Veränderung des positiven Zellmembrananteils an der Zellanzahl gemessen (siehe 3.4.3.1).

Die Syncytin Expression zeigte eine signifikante Zunahme von 29 % (SEM = 3,95) (in den unstimulierten Zellen) auf 78 % (SEM = 2,85) in der mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten 48 h BeWo Zellkultur ($p = 0,011$) und auf 85 % (SEM = 3,95) in der mit 60 µg/ml Forskolin stimulierten 48 h BeWo Zellkultur ($p = 0,012$) (siehe Abb. 32 und 33).

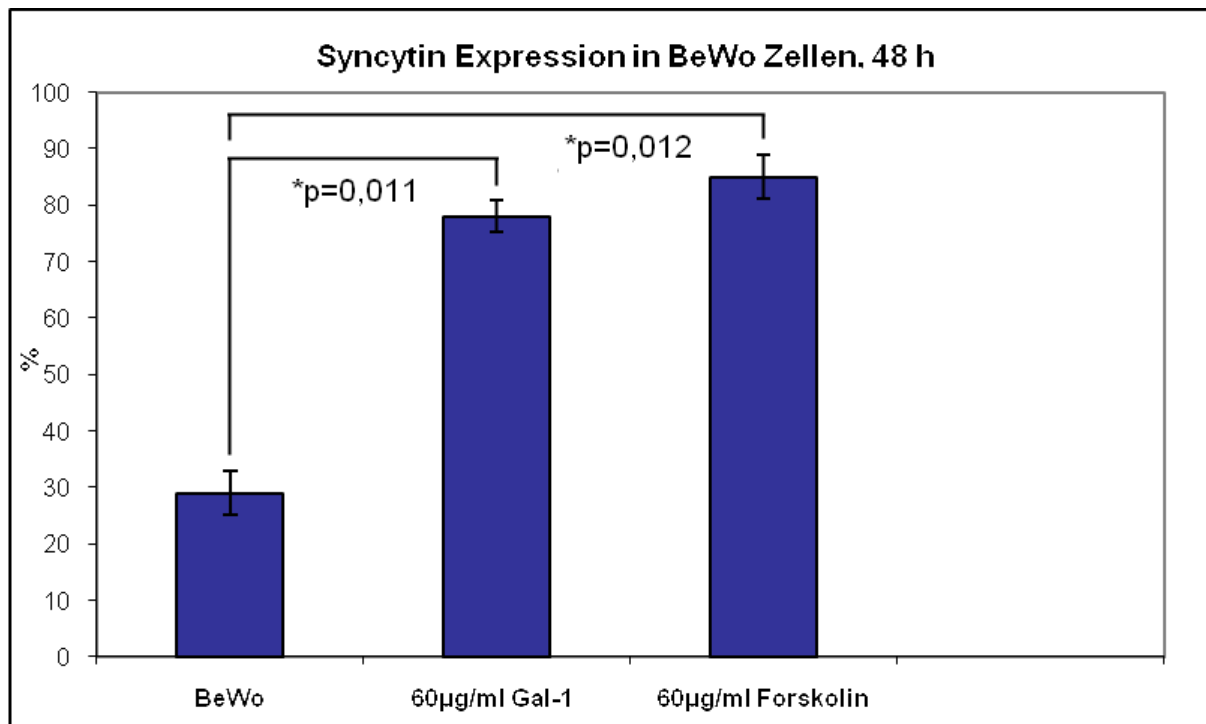


Abb. 32: Syncytin Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro. Abnahme der Expression in den mit Gal-1 und Forskolin stimulierten Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

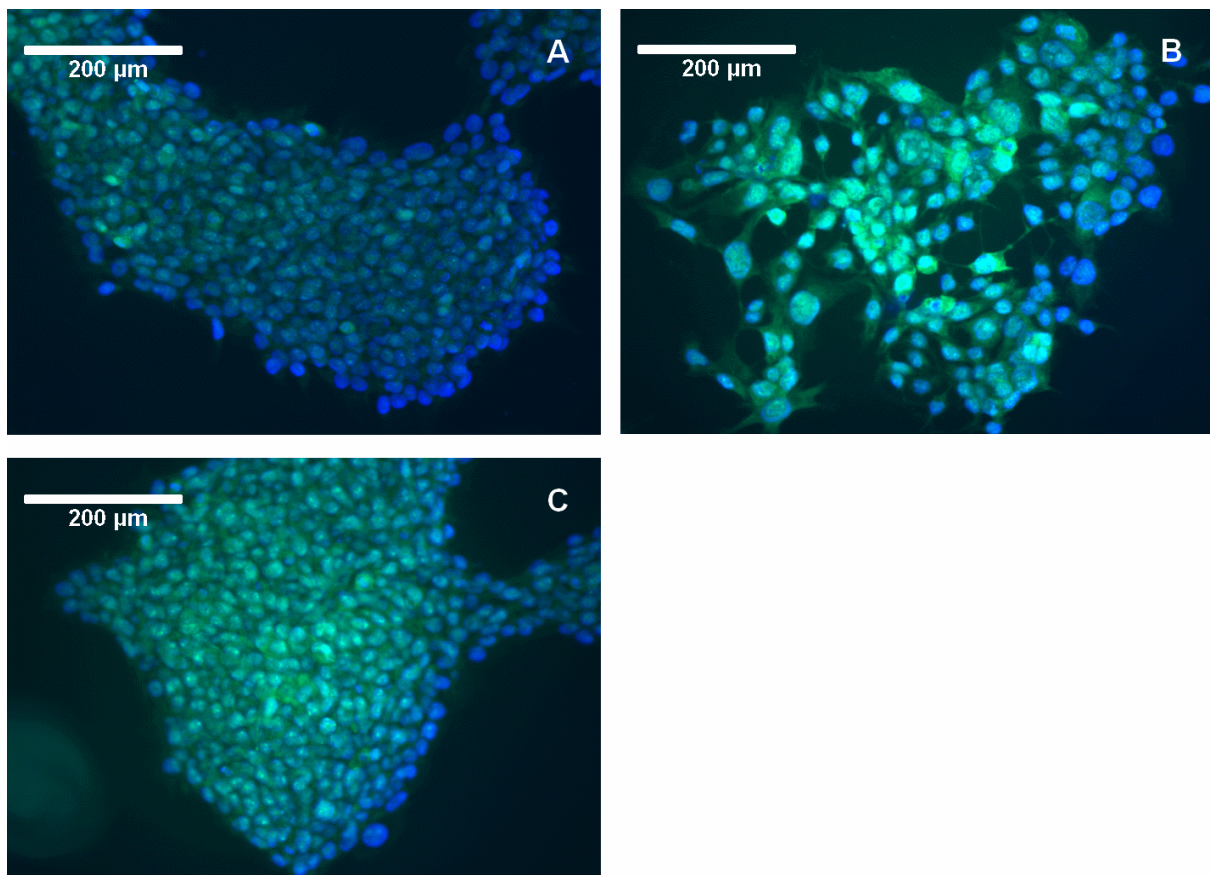


Abb. 33: **A:** Syncytin an unstim. BeWo Zellen, **B:** Syncytin an BeWo Zellen mit 60 µg/ml Forskolin stim., **C:** Syncytin an BeWo Zellen mit 60 µg/ml Gal-1 stim., 48 h in-vitro ($\times 20$).

4.2.3 Humane Zytochrom P450-Aromatase

Die rot gefärbten Zellen, die Anti-P450-Aromatase exprimierten, wurden im gesamten Präparat durch drei unabhängige Begutachter ausgezählt (siehe 3.4.3.2). Es wurde ein Mittelwert (MW) gebildet. Bei der der Negativ-Kontrolle betrug dieser MW 260, bei den mit 10 µg/ml Gal-1 stimulierten Zellen sank diese Zahl nicht signifikant auf 242 im Gegensatz zur Kontrolle, bei den mit 30 µg/ml Gal-1 stimulierten Zellen nicht signifikant auf 164 im Gegensatz zur Kontrolle und bei den mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten Zellen nicht signifikant auf 122 im Gegensatz zur Kontrolle (siehe Abb. 34 und 35).

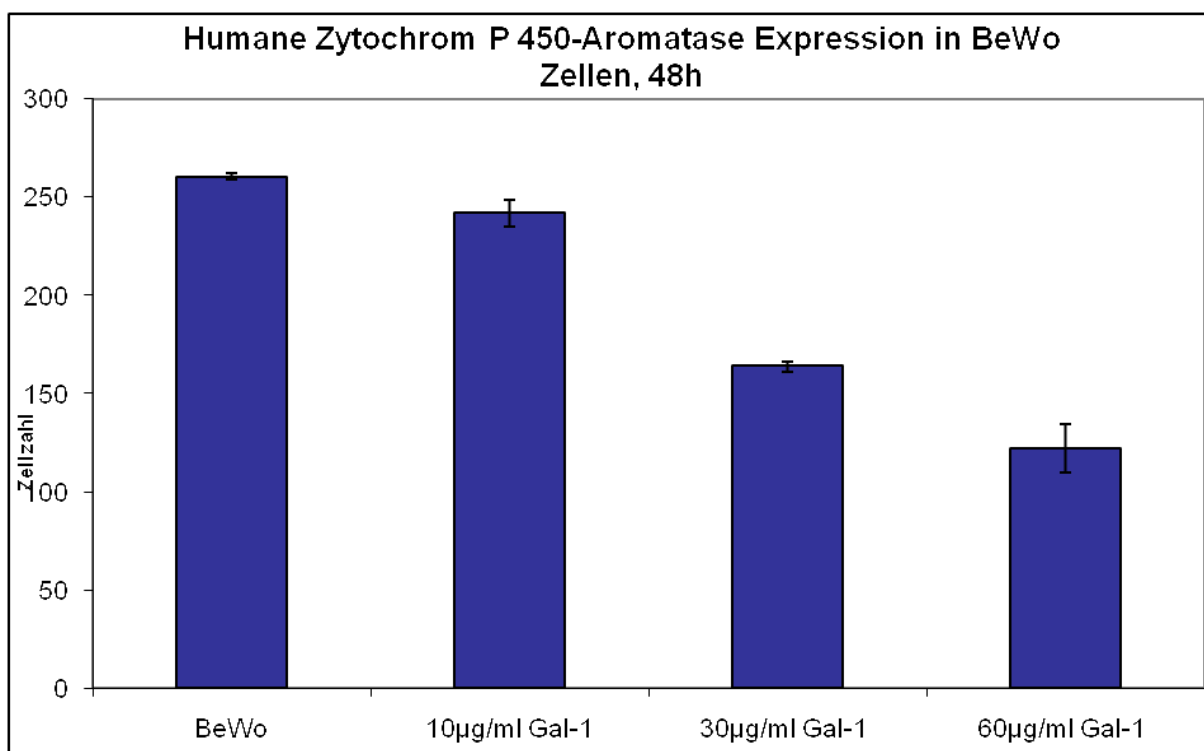


Abb. 34: Humane Zytochrom P450-Aromatase Expression in BeWo Zellen, 48 h Kultivierung in-vitro: Abnahme der exprimierenden Zellzahl mit steigender Gal-1 Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

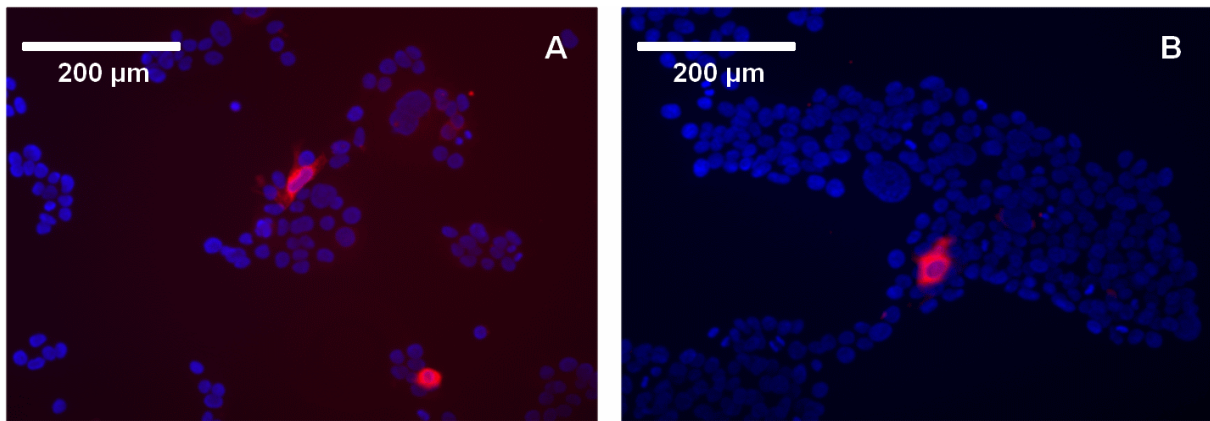


Abb. 35: Humane Zytochrom P450-Aromatase an BeWo Zellen (A), 48 h Kultivierung in-vitro, Expression von Humaner Zytochrom P450-Aromatase in BeWo Zellen stimuliert mit 60 µg/ml Gal-1, 48 h Kultivierung in-vitro (B) ($\times 20$).

4.3 PCR-Ergebnisse

4.3.1 Ki67 und E-Cadherin mRNA Expression

Es zeigte sich eine Herunterregulierung der Ki67 mRNA Expression in der mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten Probe auf 93,4 % mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ (siehe Abb. 36). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

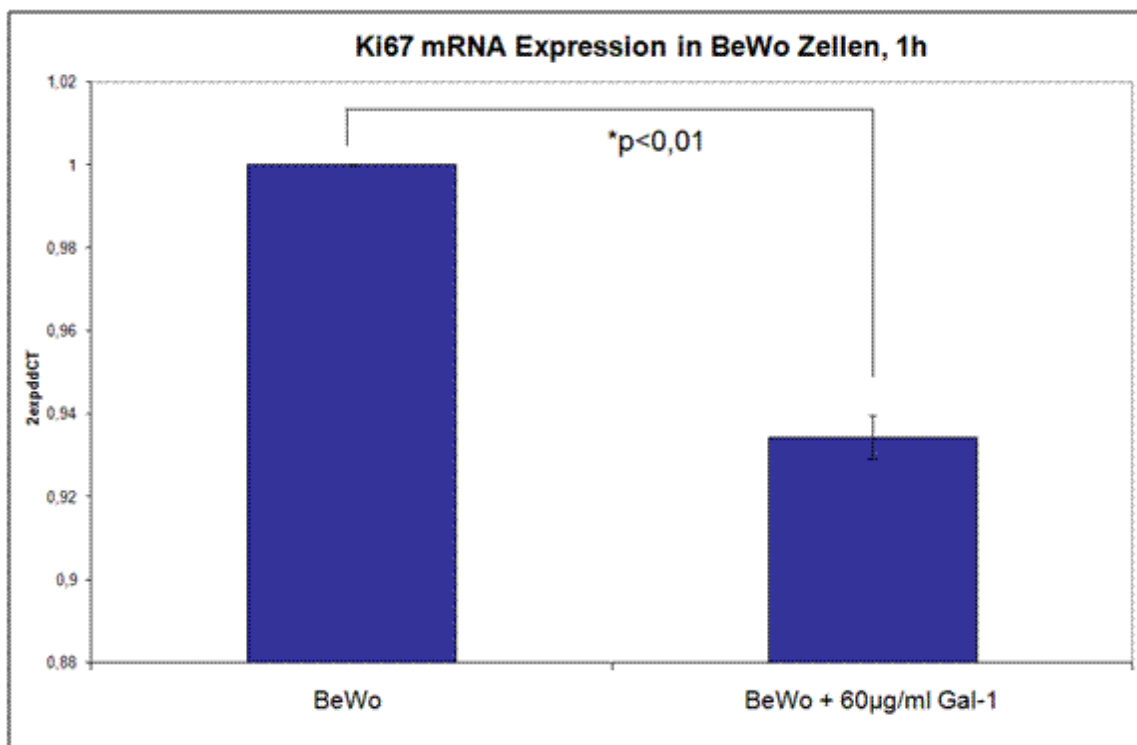


Abb. 36: Ki67 mRNA Expression in BeWo Zellen, 1 h Kultivierung in-vitro. . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Es zeigte sich eine Herunterregulierung der E-Cadherin mRNA Expression in der mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten Probe auf 78,8 % mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ (siehe Abb. 37).

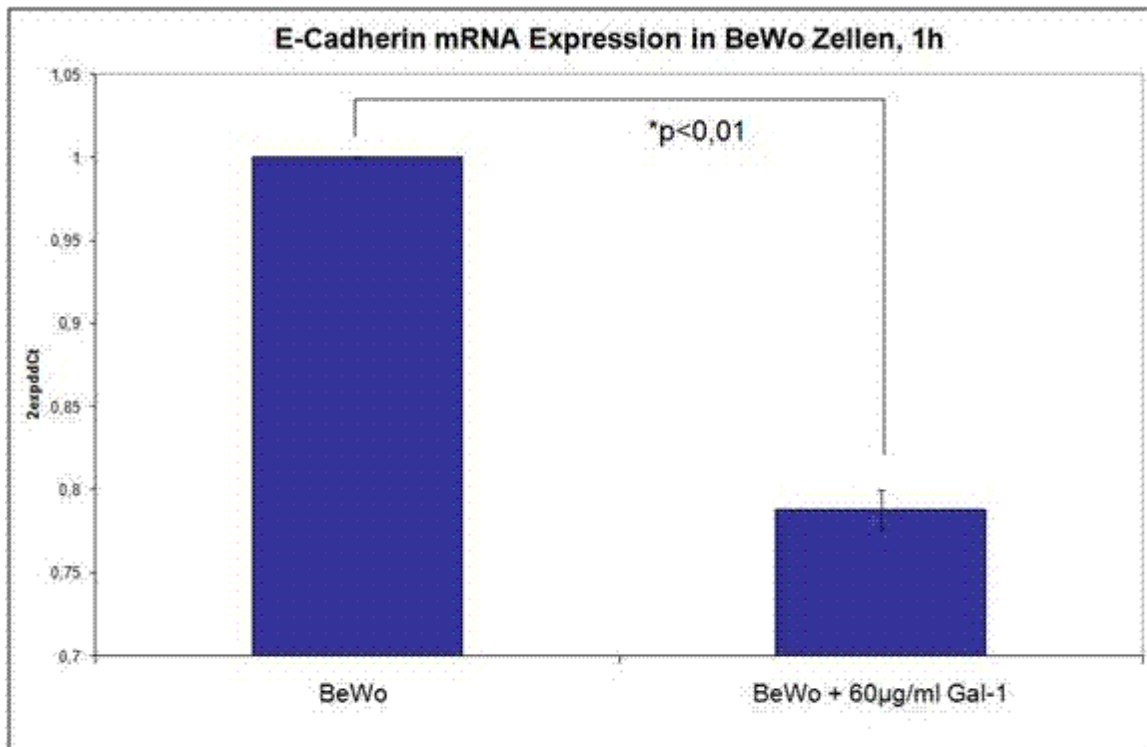


Abb. 37: E-Cad mRNA Expression in BeWo Zellen, 1 h Kultivierung in-vitro. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

4.4 Rezeptor-Tyrosinkinase Ergebnisse

4.4.1 Proteinassay nach Bradford Ergebnisse

Bei der Kontrolle zeigte sich nach der Proteinassay nach Bradford Durchführung eine Konzentration von 0,991 mg/ml. Da zuvor die Probe 1:10 verdünnt worden war, musste das Ergebnis mal 10 multipliziert werden um auf die tatsächliche Konzentration zu kommen. Zur Durchführung des Phosphorylation Antibody Array war eine Konzentration von 50-1000 µl/ml erforderlich. Die Probe wurde daraufhin in Blockingpuffer in einer Konzentration von 1000 µl/ml verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 1,2 ml gebracht, d.h. 121 µl Probe wurden in 1079 µl Blockingpuffer verdünnt (= 1200 µl).

Bei der mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten Probe zeigte sich eine Konzentration 0,717 µl/ml. Auch diese wurde wieder mal 10 multipliziert und dann in Blockingpuffer in

einer Konzentration von 1000 $\mu\text{l/ml}$ verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 1,2 ml gebracht, d.h. 167 μl Probe wurden in 1033 μl Blockingpuffer verdünnt.

Die Proben wurden dann wie in 3.6.2.3 beschrieben weiterverarbeitet.

4.4.2 Signalintensitätsergebnisse

Die Ergebnisse wurden anhand der Tabelle Phosphorylation Antibody Array Assay (siehe 3.6.3) interpretiert. Es zeigte sich eine Hemmung der Signalintensität der REarranged during Transfection (RET) Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) in der mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 stimulierten Membran im Vergleich zu der unstimulierten Membran auf 54,3 % mit einer Signifikanz von $p = 0,012$. Damit inhibiert Gal-1 die Phosphorylierung von RET intrazellulär an Tyr905. Zudem zeigte sich eine Hemmung der Signalintensität der Janus Kinase 2 (JAK2) RTK in der mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 stimulierten Membran auf 72,6 % mit einer Signifikanz von $p = 0,035$ und eine Verstärkung der Signalintensität der Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) RTK in der mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 stimulierten Membran auf 168,2 % mit einer Signifikanz von $p = 0,016$ (siehe Abb. 38 und 39).

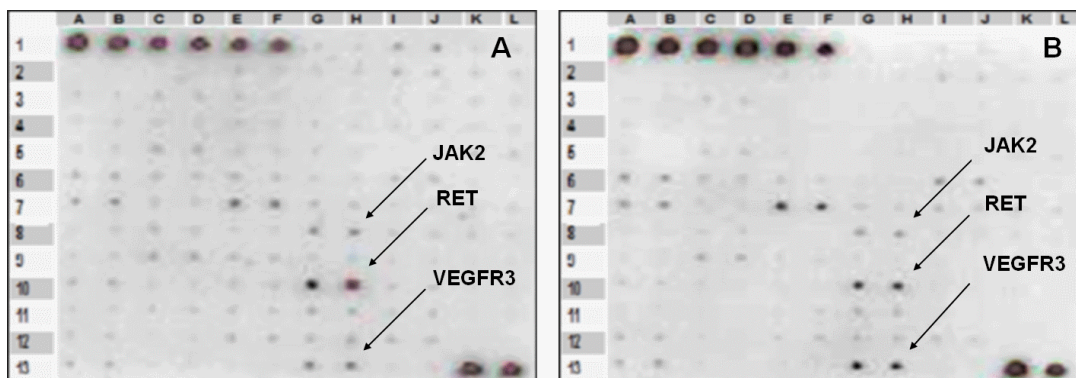


Abb. 38: Chemilumineszenz Signale der RTKs auf den Membranen in BeWo Zellen (A) verglichen mit 60 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 stimulierten Zellen (B): JAK2 (G8, H8), RET(G10, H10), VEGFR3 (G13, H13), 24 h Kultivierung *in-vitro*.

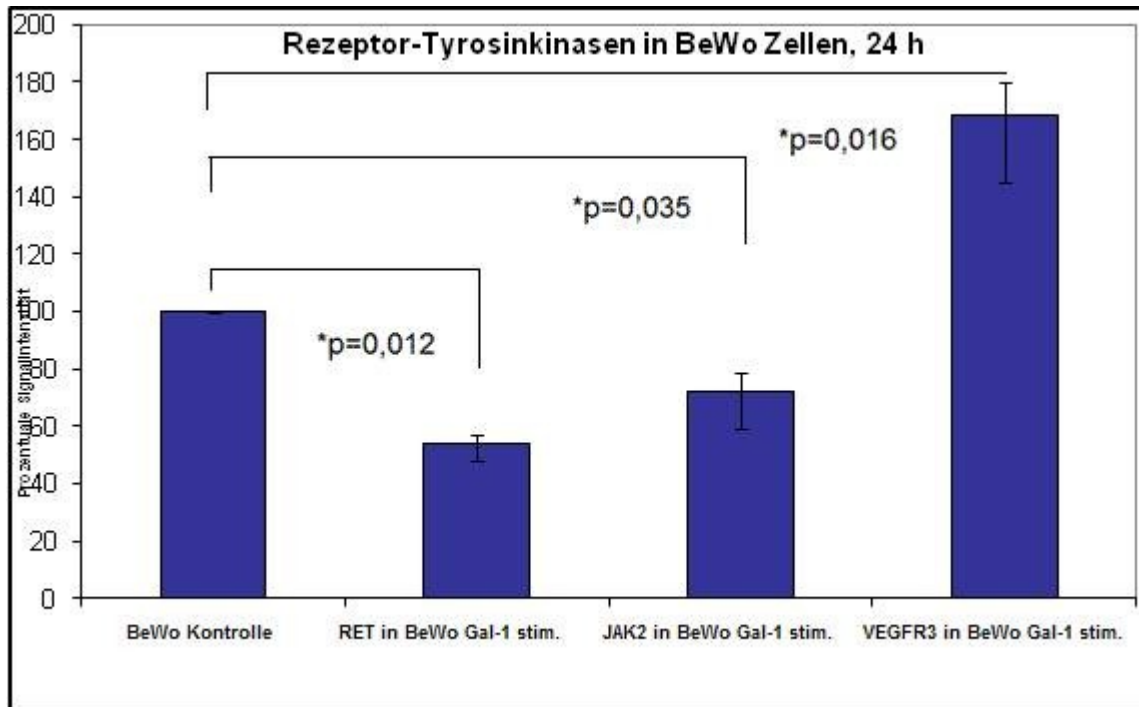


Abb. 39: Prozentuale Signalintensitätsänderung von RET, JAK2 und VEGFR3 in mit 60 µg/ml Gal-1 stimulierten BeWo Zellen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (= 100%), 24 h in vitro. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

5 Diskussion

Ergebnisse dieser Arbeit zur Analyse der Funktion von Galektin-1 bei der Synzytium-Bildung und Proliferation von Trophoblasttumorzellen BeWo waren: die Ki67- und die β -Catenin Expression wurden in der *in-vitro* 24 h Zellkultur konzentrationsabhängig durch Gal-1 inhibiert. Außerdem wurden die E-Cadherin Expression *in-vitro* in der 48 h Zellkultur und die Ki67- und die E-Cadherin-mRNA in der 1 h Zellkultur gehemmt. Die Syncytin Expression und die Leptin Expression wurden hingegen in der 48 h Zellkultur hochreguliert. Zusätzlich inhibierte Gal-1 die intrazelluläre Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen REarranged during Transfection (RET) und Janus Kinase 2 (JAK2) und stimulierte die Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase Vascular endothelial growth factor 3 (VEGFR3) in der 24 h Zellkultur.

Ergebnis zur Analyse der Beeinflussung der Enzyme der Hormonsynthese durch Gal-1 war: die P450 Aromatase wurde in der 48 h Zellkultur herunter reguliert.

Ergebnisse zur Beeinflussung der 48 h BeWo Zellkultur durch Forskolin waren: die E-Cadherin Expression wurde gehemmt, die Syncytin Expression wurde hingegen hochreguliert.

5.1 Eigenschaften von Gal-1

Gal-1 wird in vielen Geweben exprimiert und hat sowohl inhibitorische Effekte auf das Zellwachstum, wie in Neuroblastomzellen oder Chondrozyten (*Kopitz, von Reitzenstein et al. 2001; Marsich, Mozetic et al. 2008*), als auch aktivierende Effekte, wie in Lymphknotenzellen oder Mammagefäßzellen (*Moiseeva, Javed et al. 2000; Symons, Cooper et al. 2000*). Es wird in zahlreichen immunprivilegierten Geweben nachgewiesen, wie im Hodengewebe (*Dettin, Rubinstein et al. 2003*) oder der Plazenta (*Poirier, Timmons et al. 1992*) und wird in humanen Reproduktionsorganen exprimiert (*von Wolff, Wang et al. 2005*).

In der Plazenta spielt Gal-1 eine besonders große Rolle: es wird bereits im Trophektoderm von dem expandierten Blastozysten unmittelbar vor der Implantation synthetisiert (*Poirier, Timmons et al. 1992*) und durch den Synzytiotrophoblasten exprimiert. Der in die Dezidua eindringende Zytotrophoblast exprimiert Gal-1 allerdings nur schwach (*Walzel, Neels et al. 1995; Vicovac, Jankovic et al. 1998*). Der Mechanismus, wie Gal-1 mit den Zellen der Plazenta interagiert, an die

Trophoblastzellen bindet und die Proliferation der Trophoblastzellen beeinflusst, ist also von großer Bedeutung.

5.2 Gal-1 inhibiert die Proliferation von BeWo Zellen

Wir konnten die Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe nochmals bestätigen, die bereits gezeigt hatten, dass Gal-1 die Proliferation von Trophoblasttumorzellen BeWo in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibiert. Dies wurde über eine 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Inkorporation mit Hilfe einer ELISA-Technik durchgeführt (*Jeschke, Karsten et al. 2006*). In der hier vorliegenden Studie konnte nun immunzytochemisch gezeigt werden, dass Gal-1 die Expression von Ki67 in der 24 h BeWo Zellkultur herunter reguliert, was mit einer Hemmung der Proliferation einhergeht (*Zabaglo, Ormerod et al. 2003*). Diese Inhibierung von Ki67 bestätigte sich auch auf molekularer Ebene in der 1 h Zellkultur. Die schnelle Hemmung auf mRNA Ebene kann durch die Natur der Signaltransduktion und Transkriptionsinduktion erklärt werden (*Fischer, Schulze et al. 2009*). In einer vorangegangenen Studie konnten wir zeigen, dass die Apoptose von BeWo Zellen durch Gal-1 nur durch zusätzliche Stimuli wie Hyperthermie oder CO₂ Entzug gefördert wird. Die Hemmung von Ki67 ist also nicht durch den Untergang der Zellen bedingt (*Wiest, Seliger et al. 2005*).

5.3 Gal-1 inhibiert die Hormonsynthese in BeWo Zellen

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppen hatten bereits gezeigt, dass Gal-1 die Hormonsynthese beeinflusst, indem es die humanes Choriongonadotropin- (hCG) und Progesteronproduktion in BeWo Zellen inhibiert: die hCG - Produktion war sowohl auf mRNA-, wie auch auf Protein-Ebene gehemmt. Außerdem scheinen die Effekte mit der Thomsen-Friedenreich Antigen Expression auf der Zelloberfläche in Verbindung zu stehen (*Jeschke, Reimer et al. 2004*). In der hier vorliegenden Studie wurde nun gezeigt, dass Gal-1 auch die Enzyme der Hormonsynthese inhibiert: die P450 Aromatase wurde in der 48 h Zellkultur gehemmt.

5.4 Gal-1 fördert die Synzytium Bildung in BeWo Zellen

Synzytiumbildung ist ein ungewöhnlicher Prozess der nur in wenigen Zelllinien stattfindet, z.B. in Myoblasten, Osteoklasten und Trophoblasten. Der Einfluss durch Gal-1 auf die Zellfusion wurde bereits in anderen Zelltypen belegt. Gal-1 spielt demnach eine Rolle in der myogenen Fusion *in-vivo* und *in-vitro* und wird während

der Muskelfaserbildung maximal exprimiert. Außerdem können in dessen Abwesenheit Myoblasten nicht so effektiv fusionieren (*Cooper and Barondes 1990; Harrison and Wilson 1992; Georgiadis, Stewart et al. 2007*). In Endothelzellen hemmt Gal-1 hingegen die Nipah Virus induzierte Zellfusion, welche durch das Oberflächenglykoprotein NiV-F vermittelt wird und zum Zelluntergang führt (*Garner, Aguilar et al.*).

Die molekularen Mechanismen der Fusion der Trophoblastmembranen sind noch nicht vollständig erforscht. Proteine, die in die Zelladhäsion (Cadherin11) (*Getsios and MacCalman 2003*) und Zell-Zell Kommunikation (Connexin 43) (*Frendo, Cronier et al. 2003*) beeinflussen, spielen dabei eine Rolle. Es wurde zudem demonstriert, dass das Produkt des HERV-W env Gen (Env-W) ein fusogenes Membranglykoprotein ist (Syncytin), das die Synzytiumbildung in Interaktion mit dem Retrovirusrezeptor RDR induziert. Da es aber auch in Trophoblastzellen der Zellsäule, in interstitiellen und endovaskulären Trophoblasten exprimiert wird, und daher in nicht-fusionierenden Zellen, suggerieren Malassine et al., dass es für die Trophoblastzellenfusion benötigt wird, aber nicht ausreichend ist (*Malassine, Handschuh et al. 2005*).

Es wurde bereits gezeigt, dass Gal-1 Synzytiotrophoblasten und BeWo Zellen, welche *in-vitro* ein Synzytium bilden können, bindet. Gal-1 bindet jedoch nicht frisch isolierte Trophoblastzellen und Trophoblasttumorzellen JEG-3, welche kein Synzytium bilden können (*Jeschke, Reimer et al. 2004*). Außerdem bindet Gal-1 an das Thomsen–Friedenreich Epitop (TF-Antigen), welches das Kohlenhydratmolekül Galactose- β 1–3N-acetylgalactosamine (Gal β 1–3GalNAc-) enthält, und in mehr als 85% der humanen Karzinome (*Springer 1984*), in Synzytiotrophoblasten, extravillösen Trophoblastzellen und Trophoblasttumorzellen BeWo exprimiert wird (*Jeschke, Karsten et al. 2006*).

Es wurde zudem demonstriert, dass zwei identische Galektin-Monomere ein nicht kovalent verknüpftes Homodimer mit zwei Kohlenhydrat erkennenden Domänen (CRD) für die Bindung von Gal β 1-4GlcNAc Sequenzen, bilden. Außerdem liegt Gal-1 in Lösung bevorzugt als Dimer vor (*Morris, Ahmad et al. 2004*): die daraus resultierende Bivalenz erleichtert eine glykanvermittelte Zelloberflächenrezeptorbindung, welche wichtig ist um Signalwege zu beeinflussen (*Perillo, Pace et al. 1995; Walzel, Blach et al. 2000*). Es stellte sich daher die Frage,

ob Gal-1 mit seinen zwei Kohlenhydratbindungsstellen die Fusionsbildung von Trophoblastzellen beeinflussen kann.

In dieser Studie wurde nun gezeigt, dass Gal-1 die Fusion in BeWo Zellen fördert. Um die Synzytiumbildung zu untersuchen, wurde immunzytochemisch die β -Catenin Expression bestimmt, welche ein Indikator für die Synzytiumbildung in Trophoblastzellen darstellt (*Getsios, Chen et al. 2000*). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der β -Catenin Färbung der BeWo Zellmembranen in der 24 h Zellkultur. Die Induzierung der Fusionsbildung wurde zudem durch die Hochregulierung der immunzytochemischen Expression von Leptin in der 48 h Kultur bestätigt, welches einen Marker für die Synzytiumbildung darstellt (*Masuzaki, Ogawa et al. 1997*).

Weiterhin zeigte sich eine Hemmung der E-Cadherin Expression in der Immunfluoreszenz nach Gal-1 Stimulierung der 48 h BeWo Zellkultur. Die Herunterregulierung von E-Cadherin zeigte sich auch auf mRNA Ebene in der 1 h BeWo Zellkultur. Das Verschwinden von E-Cadherin von den Zellgrenzen, parallel zur Herunterregulierung der mRNA, wird als Indikator der Synzytiumbildung in normalen Trophoblastzellen und -tumorzellen BeWo verwendet (*Coutifaris, Kao et al. 1991*). Dies konnte auch durch immunoneutralisierende Studien mit einem E-Cadherin Antikörper bestätigt werden. In Übereinstimmung mit diesen Studien zeigten immunzytologische E-Cadherin Färbungen, dass die Synzytiumbildung der BeWo Zellen nach Stimulierung mit Forskolin beschleunigt ist (*Wice, Menton et al. 1990; Al-Nasiry, Spitz et al. 2006*). Um unsere Ergebnisse zu unterstreichen, untersuchten wir den Einfluss von Forskolin auf die Synzytiumbildung in BeWo Zellen: die Färbeintensitätsergebnisse waren identisch mit den Immunfluoreszenzbildern nach Gal-1 Stimulierung. Um zu beweisen, dass diese Kaskade ein De novo Ereignis ist welches durch Gal-1 induziert wird, wurde der Einfluss auf Syncytin untersucht, welcher als Fusionsmarker fungiert (*Malassine, Handschuh et al. 2005*): Syncytin war in der 48 h BeWo Zellkultur nach Stimulierung mit Gal-1 hochreguliert. Dieser Effekt konnte auch auf mRNA Ebene nachgewiesen werden (*Fischer, Redel et al.*).

Die Hemmung der Proliferation durch Gal-1 kann nun folgendermaßen erklärt werden. Synzytiumbildung und Proliferationsinhibierung sind gekoppelte Ereignisse: da nur nicht-fusionierte BeWo Zellen proliferieren, wird Ki67 als Proliferationsmarker bereits in der 24 h durch Gal-1 verändert; Leptin und Syncytin als Synzytium

Bildungs-Marker und E-Cadherin, als Synzytium Indikator werden hingegen erst in der 48 h Zellkultur durch Gal-1 beeinflusst. Die Assoziation mit β -Catenin, welches mit dem zytoplasmatischem Ende des Transmembran-Adhäsionsmolekül E-Cadherin interagiert (Ozawa, Baribault et al. 1989) und es über α -Catenin an das Aktin-Zytoskelett koppelt (Hinck, Nathke et al. 1994), ist für die Cadherin vermittelte Zell-zu-Zell Adhäsion erforderlich (Polakis 2000). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie, da die β -Catenin Expression bereits nach 24 h durch Gal-1 gehemmt wird, die E-Cadherin Expression erst nach 48 h.

In einer Studie wurde der Effekt von Forskolin auf zwei verschiedene Trophoblasttumorzelllinien verglichen: hierbei zeigte sich, dass die Proliferation, welche durch eine Immunfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ki67 deutlich gemacht wurde, in BeWo Zellen erniedrigt ist, in JEG-3 Zellen, welche kein Synzytium bilden können, hingegen erhöht ist (Al-Nasiry, Spitz et al. 2006). Die unterschiedliche Reaktion könnte auf die Eigenschaft zur Fusionsbildung zurückgeführt werden. Diese Eigenschaft könnte bei der Signalwegauswahl in der Trophoblastdifferenzierung eine Rolle spielen. Obwohl man vorsichtig sein sollte, die Ergebnisse solcher Studien auf physiologische Trophoblastzellpopulationen zu übertragen, kann es jedoch hilfreich sein, diese Zelllinien als spezifische Modelle in der Identifikation von Defekten in der Synzytiumbildung herzunehmen. Das könnte dazu beitragen, die Mechanismen, welche die Signalwegauswahl in der Trophoblastdifferenzierung kontrollieren, in normalen und pathologischen Schwangerschaften zu untersuchen.

Es wurde demonstriert, dass eine starke Expression von Gal-1 in dezidualen stromalen Zellen in Präeklampsie Plazenten und eine starke Gal-1 Membranfärbung in extravillösen Trophoblasten in Präeklampsie Plazenten im Vergleich zu normalen Kontrollen von einer signifikant erhöhten TF Expression in extravillösen Trophoblasten in Präeklampsie Plazenten begleitet wird. Daher ist es wahrscheinlich, dass die starke Gal-1 Expression oder die Gal-1 Bindung an die Membran der EVT in Präeklampsie Plazentas durch eine starke TF-Antigen Expression dieser Zellen hervorgerufen wird (Jeschke, Mayr et al. 2007). Die Trophoblasttumorzelllinie BeWo wurde kürzlich mit kultivierten Zotten einer Präeklampsie Plazenta, welche durch Crocker et al. beschrieben wurde, verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Zellkulturen in zwei Aspekten ähneln: erstens zeigten beide eine höhere hCG-Sekretion und eine verstärkte Apoptoseantwort auf $\text{TNF}\alpha$ im Vergleich zu JEG-3

Zellen und normalen Zotten, zweitens zeigten BeWo Zellen und Präeklampsie-Zotten eine Hemmung der Proliferation in Antwort auf Forskolin und Hypoxie, im Vergleich zu normalen Zotten und JEG-3-Zellen, welche kein Synzytium bilden können (Crocker, Tansinda et al. 2004; Al-Nasiry, Spitz et al. 2006). Es ist daher möglich, dass Defekte in der Synzytiumbildung eine Rolle in der Pathologie der Präeklampsie spielen. Diese Erklärung, zusammen mit der Annahme, dass Gal-1 die Synzytiumbildung stimuliert und in Präeklampsie-Plazenten verstärkt exprimiert wird, könnte vermuten lassen, dass die Rolle von Gal-1 in der Pathologie von der Präeklampsie mit seiner Eigenschaft zur Synzytiumbildung zusammen hängt.

5.5 Gal-1 beeinflusst Rezeptor-Tyrosinkinasen in BeWo Zellen

Tyrosinphosphorylierung, welche Signalwege wesentlich beeinflusst, wird durch zwei gegensätzliche Enzymaktivitäten kontrolliert: Proteintyrosinkinasen (PTK) und Proteintyrosinphosphatasen (PTP). PTKs sind in die Trophoblastdifferenzierung und -proliferation (Hamlin and Soares 1995; Daoud, Rassart et al. 2006), PTPs sind in die Trophoblastfusion involviert (Vargas, Moreau et al. 2008). Wir haben nun untersucht, welche Tyrosinkinase-Rezeptor Phosphorylierungen an Trophoblastzellen durch Gal-1 beeinflusst werden: hierbei zeigte sich eine stärkere Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) REarranged during Transfection (RET) in der Kontrolle im Vergleich zu den mit Gal-1 stimulierten Zellen. Zusätzlich konnten wir in ein Studie immunzytochemisch zeigen, dass Gal-1 die Phosphorylierung von RET⁹⁰⁵ hemmt (Fischer, Schulze et al. 2009).

Das RET-Protoonkogen codiert eine Rezeptor-Tyrosinkinase (Takahashi, Buma et al. 1988), welche wichtig ist für die Entwicklung des Nervensystems und der Niere (Schuchardt, D'Agati et al. 1994). Die glialen Familien-Liganden (GFL) üben ihre physiologische Funktionen über eine Aktivierung von RET Tyrosinkinasen aus, binden hierbei aber nicht direkt an die extrazelluläre Domäne von RET, sondern über Glykosylphosphatidylinositolgebundene Zelloberflächenproteine (Airaksinen, Titievsky et al. 1999). Gal-1 könnte eine ähnliche, Kohlenhydratvermittelte Zelloberflächenbindung an RET aufweisen, z.B. über das TF-Antigen. Zahlreiche Signalwege, unter anderem Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), PI3K, p38, Extrazellulär regulierte Kinase (ERK)-5, Phospholipase C- γ und signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) werden durch RET aktiviert (Chiariello, Visconti et al. 1998; Schuringa, Wojtachnio et al. 2001; Fukuda, Kiuchi et

al. 2002). RAS/ERK, p38MAPK spielen auch eine Rolle in T-Zellaktivierungen durch Gal-1 (Hayashi, Ichihara et al. 2000; Paz, Haklai et al. 2001; Fuertes, Molinero et al. 2004). Obwohl bisher keine Mutationen von RET in Trophoblastzellen untersucht worden sind, ist bekannt, dass RET in zahlreichen anderen Zellen mutiert ist (Jhiang 2000). Außerdem konnten Plaza Menacho et al. zeigen, dass RET^{Y791F} und RET^{S891A} über den STAT3- und den Janus Kinase (JAK) Signalweg phosphoryliert und aktiviert werden. Da vier verschiedene Zelllinien (HepG2, HEK293, COS-7, and SKN-SH) ähnliche Ergebnisse lieferten, ist die Aktivierung von STAT3 durch RET^{Y791F} und RET^{S891A} Mutanten nicht Zelltyp-abhängig. Dies suggeriert, dass STAT3 durch verschiedene Krankheitsassoziierte RET-Mutationen über unterschiedliche Signalwege aktiviert wird (Plaza Menacho, Koster et al. 2005). Analysen der Signalwege welche über phosphoryliertes Y905 in Trophoblastzellen aktiviert werden, werden dazu beitragen, Mutationen aufzudecken, welche durch Konformationsänderungen des Tyrosinrestes bedingt sind und für die Entstehung von Krankheiten verantwortlich sind (Fischer, Schulze et al. 2009).

Zuvor konnte demonstriert werden, dass JAK-STAT einen wichtigen Signalweg in Trophoblastzellen darstellt (Fitzgerald, Poehlmann et al. 2008). Wir konnten nun zeigen, dass die Phosphorylierung von JAK2 in den mit Gal-1 stimulierten Zellen, ähnlich wie bei RET, herunter reguliert war im Vergleich zur Kontrolle, was suggeriert, dass JAK2 und RET BeWo Zellen über den gleichen Signalweg beeinflussen könnten, der auch über STAT3 laufen könnte (Fischer, Schulze et al. 2009).

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass Gal-1 die Proliferation von BeWo Zellen konzentrationsabhängig inhibiert (Jeschke, Karsten et al. 2006). In einer weiteren Studie, konnten wir demonstrieren, dass Gal-1 die Apoptose-Rate von MCF7 und BeWo Zellen nicht signifikant fördert. Nur unter Stressbedingungen (Hyperthermie, CO₂ und FCS Entzug) war die Apoptose-Rate in beiden Zelllinien signifikant erhöht (Wiest, Seliger et al. 2005). In dieser Studie konnten wir nun zeigen, dass die Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase Vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) in den Gal-1 stimulierten Zellen höher war als in der Kontrolle (Fischer, Schulze et al. 2009). VEGFR3 wird in lymphatischen Endothelzellen, sowie in Kapillaren und Venen von endokrinen Organen exprimiert. In einem murinen Modell konnte demonstriert werden, dass die Behandlung mit einem VEGFR3-Ig Fusionsprotein zu einer Inhibierung der

Lymphknotenmetastasierung und Tumorangiogenese führte (*Shibuya and Claesson-Welsh 2006*). Außerdem wurde die VEGFR3 Expression in Trophoblastzellen zuvor beschrieben (*Schiessl, Innes et al. 2009*). Kurenova et al. konnten zudem zeigen, dass die VEGFR3 Überexprimierung in MCF7 Zellen die Proliferation um 40% erhöhte und zu einer Förderung der Motilität und Invasion und zu einer Stimulierung des Zellüberlebens unter Stressbedingungen (Staurosporin Behandlung) führte (*Kurenova, Hunt et al. 2009*). Zusammen mit den Ergebnissen dieser Studie, gehen wir davon aus, dass die Inhibierung der Proliferation durch Gal-1 nicht durch die Apoptoseinduktion der Zellen vermittelt wird, sondern durch die VEGFR3-Phosphorylierungsinduktion erklärt werden könnte.

5.6 Mögliche zukünftige klinische Anwendung von Gal-1

Gal-1 beeinflusst das Immunsystem auf vielen Ebenen und moduliert die Immunzellfunktionen, indem es die T-Zell-Proliferation inhibiert (*Rabinovich, Ramhorst et al. 2002*), die Apoptose von T-Zellen fördert (*Perillo, Pace et al. 1995*), das Zytokinegleichgewicht *in-vivo* zum Typ II verschiebt (*Rabinovich, Daly et al. 1999*), in experimentellen Autoimmunmodellen einen Shift der Immunantwort hin zu einem T-Helfer 2 (Th2) stimuliert (*Toscano, Commodaro et al. 2006*) und einen Schlüsseffektor in der Regulierung der CD4⁺CD25⁺ T-Regulatorischen Zellen (TReg Zellen) darstellt (*Garin, Chu et al. 2007*). Ein Th2 Profil ist bedeutend für eine erfolgreiche Schwangerschaft (*Lin, Mosmann et al. 1993*). Zudem spielen CD4⁺CD25⁺ TReg Zellen eine wichtige Rolle in der fetomaternalen Toleranz (*Sasaki, Sakai et al. 2004*). In einer neueren Studie konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, dass eine Gal-1-Behandlung das Zytokinprofil während der Schwangerschaft hin zu einem Th2-Typ verschiebt, CD4⁺CD25⁺ TReg Zellen in der Gebärmuttermukosa wiederherstellt und einen fetalen Abgang unterbindet. Gal-1 stellt somit ein potentielles therapeutisches Targetprotein dar (*Blois, Illarregui et al. 2007*).

Des Weiteren weisen Trophoblast- und Tumorzellen viele Ähnlichkeiten auf, unter anderem die Reduktion oder den Verlust der MHC Antigen Expression: so hat der Synzytiotrophoblast keine HLA Klasse I Proteine (*Proll, Blaschitz et al. 1999*). Obwohl dies zu einem Schutz des Feten vor dem Immunsystem führt, sensibilisiert es dennoch den Trophoblasten für eine Erkennung und Zerstörung durch Natürliche Killerzellen (NK). Da Trophoblastzellen aber dagegen resistent sind (*Avril,*

Jarousseau et al. 1999), diskutieren Clark et al. ein spezieserkennendes System, das durch Rezeptoren und Glykoproteinliganden gebildet wird (*Clark, Dell et al. 2001*), und in welchem das TF-Antigen eine Rolle spielen könnte.

Tatsächlich ähnelt die Plazentabildung in vielen Aspekten der Invasion durch maligne Tumoren. An der Implantationsseite dringen Trophoblastzellen in die maternale Dezidua ein: der Kontakt ist im ersten Trimester der Schwangerschaft am intimsten (*Hammer, Blaschitz et al. 1999*). Da die TF-Antigen Expression der extravillösen Trophoblastzellen aber auf das erste und zweite Trimester beschränkt ist, könnte Gal-1 eine Rolle als Suppressor von maternalen T-Zellen innerhalb der Dezidua spielen. In einem experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Gal-1 Expression durch die Transfektion mit einer Gal-1 antisense cDNA zu einer Verbesserung der Tumorrejektion und zu einer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell vermittelten tumorspezifischen Immunantwort in murinen Melanomzellen führt (*Rubinstein, Alvarez et al. 2004*). Zudem wurde Gal-1 ein Einfluss in der Tumorprogression zugeschrieben, unter anderem in der Zelladhäsion: Gal-1 reguliert demnach die Zell-Zell und Zell-ECM Adhäsion (Extrazelluläre Membran) und modifiziert Zellmotilität und Aggregation, welche wichtige Stufen in der Tumorzellinvasion und Metastasierung darstellen (*Hughes 2001*). Zusätzlich konnte in einem murinen Modell gezeigt werden, dass Gal-1 für die Tumorangiogenese benötigt wird und somit als Targetprotein in der angiostatischen Therapie fungieren könnte (*Thijssen, Barkan et al. ; Thijssen, Postel et al. 2006*).

Ob dieser Effekt therapeutisch beim Menschen genutzt werden kann, ist allerdings noch unklar. Aufgrund der aktuellen intensiven Forschungen bezüglich von Gal-1 werden sich in den nächsten Jahren sicherlich weitere klinische Anwendungen dieses Lektins etablieren.

6 Zusammenfassung

Galektin-1 wird in vielen Geweben exprimiert, unter anderem in humanen Reproduktionsorganen (*von Wolff, Wang et al. 2005*) und in zahlreichen immunprivilegierten Geweben (*Poirier, Timmons et al. 1992*). Das Lektin hat sowohl inhibitorische (*Marsich, Mozetic et al. 2008*), als auch aktivierende Effekte auf das Zellwachstum (*Moiseeva, Javed et al. 2000*). Zudem wird Gal-1 ein Einfluss in der Tumorprogression zugeschrieben, unter anderem in der Zelladhäsion (*Hughes 2001*) und in der Tumorangiogenese (*Thijssen, Postel et al. 2006*): tatsächlich ähnelt die Plazentabildung in vielen Aspekten der Invasion durch maligne Tumoren. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Gal-1 in der Plazenta eine große Rolle spielt. Die Bindung von Gal-1 an die Trophoblastzellen und die Beeinflussung der Proliferation sind daher von zentraler Bedeutung.

Da zwei identische Galektin-Monomere ein nichtkovalent verknüpftes Homodimer mit zwei Kohlenhydrat erkennenden Domänen (CRD) bilden (*Morris, Ahmad et al. 2004*), stellte sich die Frage, wie Gal-1 mit seinen zwei Kohlenhydratbindungsstellen die Fusionsbildung von Trophoblastzellen beeinflusst.

Wir konnten nun in der hier vorliegenden Studie zeigen, dass Gal-1 die Synzytiumbildung fördert. Dies wurde anhand der Inhibierung der β -Catenin- und der E-Cadherin Expression und der Hochregulierung der Leptin- und Syncytin-Protein Expression durch Gal-1 *in vitro* in BeWo Zellen demonstriert. Da die Synzytiumbildung und Proliferationsinhibierung gekoppelte Ereignisse sind, kann die Hemmung der Proliferation durch Gal-1, welche wir mit der Inhibierung von Ki67 auf Protein- und auf mRNA-Ebene demonstriert haben, erklärt werden (*Fischer, Redel et al.*).

Wir haben außerdem den Einfluss von Gal-1 auf die Phosphorylierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren an Trophoblastzellen untersucht: hierbei zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3) in den Gal-1 stimulierten BeWo Zellen (*Fischer, Schulze et al. 2009*). Die Überexprimierung von VEGFR3, das in Trophoblastzellen exprimiert wird (*Schiessl, Innes et al. 2009*), stimuliert die Proliferation in MCF7 Zellen unter Stressbedingungen (*Kurenova, Hunt et al. 2009*). Da wir zuvor zeigen konnten, dass Gal-1 die Apoptose-Rate von MCF7 nur unter Stressbedingungen erhöht (*Wiest, Seliger et al. 2005*), gehen wir davon aus, dass die Proliferationsinhibierung durch

Gal-1 nicht durch die Apoptoseinduktion der Zellen vermittelt wird, sondern durch die VEGFR3-Phosphorylierungsinduktion erklärt werden könnte.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen REarranged during Transfection Rezeptor (RET) und Janus Kinase 2 (JAK2) in den mit Gal-1 stimulierten Zellen im Vergleich zu der Kontrolle inhibiert wurden (*Fischer, Schulze et al. 2009*). Zuvor konnten Plaza Menacho et al. demonstrieren, dass RET^{Y791F} und RET^{S891A} über den STAT3- und den JAK Signalweg phosphoryliert und aktiviert werden (*Plaza Menacho, Koster et al. 2005*). Außerdem ist bekannt, dass der Janus Kinase-Signal transducer und activator of transcription cytokine signal transducing pathway (JAK-STAT) ein wichtiger Signalweg in Trophoblastzellen ist (*Fitzgerald, Poehlmann et al. 2008*). Zusammen mit unseren Ergebnissen suggeriert dies, dass die Rezeptor-Tyrosinkinasen JAK2 und RET die BeWo Zellen über den gleichen Signalweg beeinflussen könnten, der auch über die STAT3 Kinase laufen könnte (*Fischer, Schulze et al. 2009*). Da die Kenntnis über die genaue Signalweiterleitung von Gal-1 in Trophoblastzellen von zentraler Bedeutung ist, wird weiterhin intensiv untersucht werden, ob eine therapeutische Anwendung dieses in den letzten Jahren zunehmend ins wissenschaftliche Interesse geratenen Proteins möglich ist.

7 Bezugsquellenverzeichnis

Zellkultur

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 175 cm ²	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Sterile Tubes	Falcon Becton Dickinson Labware, USA
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf, Deutschland
„Pipett-Boy“	Eppendorf, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen, 2ml-50ml	Eppendorf, Deutschland
Pipetten, versch. Größen	Eppendorf, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Deutschland
Mini Spin	Eppendorf, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld - Deutschland
Chamberslides	Nunc, USA
Reagenzien	Bezugsquelle
Dulbecco's MEM, 500ml	Biochrom AG, Deutschland
PBS, 500ml	Biochrom AG, Deutschland
FCS (fötale Kälber-Serum), 500ml	Biochrom AG, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,5/0,2%	GibcoBRL Life Technologies, Schottland
Trypan Blau	Sigma Missouri, USA
Chemikalien	Bezugsquelle
Plazentares Galectin-1	Arbeitsgruppe Dr. Walzel, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Uni Rostock - Deutschland
Rekombinantes Humanes Gal-1, 250 µg	Sigma Missouri, USA

Immunzytologie

Chemikalien	Bezugsquelle
Vectastain Elite ABC-Kit Mouse IgG	Vector Laboratories, USA
Vectastain Elite ABC-Kit Sheep IgG	Vector Laboratories, USA
Vectastain Elite ABC-Kit Rabbit IgG	Vector Laboratories, USA
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, USA
Ultra V Block, Blockierserum	Lab Vision, USA
Verdünnungsmedium	Dako, Dänemark
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Deutschland
Methanol, Ethanol	Apothekenbedarf der LMU München - Deutschland
Hämalaun	Apothekenbedarf der LMU München - Deutschland
AEC+	Dako, Dänemark
Antikörper	Bezugsquelle
Monoclonaler Anti-human Ki67 Antigen	Dako, Dänemark
Klon Mib-1 Code Nr. M 7240	
Polyklonaler Sheep anti Leptin	AbDSerotec, UK
Polyklonaler Rabbit anti β-Catenin	Diagnostic Biosystems, USA

Immunfluoreszenz

Reagenzien	Bezugsquelle
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, USA
Ultra V Block, Blockierserum	Lab Vision, USA
Verdünnungsmedium	DAKO, Dänemark
Forskolin	Sigma Aldrich, USA
Primärantikörper	Bezugsquelle
E-Cadherin Mouse Ig1, Klon: HECD-1	Calbiochem, Deutschland
Pan-Keratin Klon A45-B/B3	
Ausgangskonzentration: 1mg/ml	Mikromet, Deutschland
Mouse IgG direkt markiert mit Cy3	
Anti- β -Hydroxysteroiddehydrogenase	BioGenesis, USA
Rabbit (polyklonal)	
Syncytin IgG (polyklonal)	Abnova, USA
Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Rabbit-Anti-Mouse IgG Cy2 markiert	Dianova, Deutschland
Ausgangskonzentration: 1,6mg/ml	
Goat-Anti-rabbit IgG Cy 2 markiert	Jackson ImmunoResearch, USA
Goat-Anti-Mouse IgG Cy 3 markiert	Jackson ImmunoResearch, USA
Goat-Anti-Rabbit IgG Cy2 (polyklonal)	Dianova, Deutschland

RNA-Gewinnung

Reagenzien	Bezugsquelle
96% Ethanol	Apothekenbedarf der LMU München - Deutschland
β -Mercaptoethanol	Apothekenbedarf der LMU München – Deutschland
Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
NucleoSpin Filter	Macherey-Nagel, - Deutschland
NucleoSpin Säule	Macherey-Nagel, Deutschland
Sammelgefäß	Macherey-Nagel, Deutschland
2ml Gefäß	Eppendorf, Deutschland
Chemikalien	Bezugsquelle
Nucleospin®RNAII Kits	Macherey-Nagel, Deutschland
RNAse freie rDNAse	Macherey-Nagel, Deutschland
Reaction Puffer für rDNAse	Macherey-Nagel, Deutschland
RNAse freies Wasser	Macherey-Nagel, Deutschland
RA1, RA2, RA3 Puffer	Macherey-Nagel, Deutschland
Membran Desalting Puffer	Macherey-Nagel, Deutschland

RNA-Umschreibung

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Applied Biosystems, Deutschland
10 × RT Puffer	Applied Biosystems, Deutschland
10 × RT Random Primer	Applied Biosystems, Deutschland
25 × dNTP Mix	Applied Biosystems, Deutschland
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Applied Biosystems, Deutschland
Reverse Transcriptase	Applied Biosystems, Deutschland
Mastercycler	Eppendorf, Deutschland

PCR

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
1000 µl Sterile Filter Spitzen mit Sealing Filter	Biozym, Deutschland
100 µl Sterile Filter Spitzen mit Sealing Filter	Biozym, Deutschland
10 µl Sterile Filter Spitzen	Biozym, Deutschland
PCR Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Deutschland
MicroAmp FastOptical 96-Well Reaktionsplatte mit Barcode (0,1 ml)	Applied Biosystems, USA
MicroAmp Optical Cabs	Applied Biosystems, USA
Cap installing Tool	Applied Biosystems, USA
Gerät, Software	Bezugsquelle
7500 FastSystems Real Time PCR Systems	Applied Biosystems, USA
Sequence Detection Software v1.3.1	Applied Biosystems, USA
7500 Fast Systems	
Chemikalien	Bezugsquelle
TaqMan®PCR Master Mix (2 ×)	Applied Biosystems, USA
steriles Wasser	Machery-Nagel, Deutschland
Primer&Probe	Bezugsquelle
GAPDH, Hs99999905_m1	Applied Biosystems, USA
E-Cadherin, Hs00170423_m1	Applied Biosystems, USA
Ki67, Hs00606991_m1	Applied Biosystems, USA

RTK

Chemikalien	Bezugsquelle
RayBio Phosphorylation Antibody Array I	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Lysispuffer	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Washing Buffer I und II	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Biotinylierter Anti-Phosphotyrosin	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Blockingpuffer	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
HRP-konjugiertes Streptavidin Konzentrat	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Detektionspuffer A und B	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Membran	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
8 Well-Gefäß	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Petrischalen	Ray Biotech, Inc. Nr. AAH-PRTK-1-8, USA
Geräte, Software	Bezugsquelle
Rüttler, Typ 3006	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Deutschland
Gel-Dokumentations-Gerät	Bio-Rad Laboratories, UK
Universal Hood II	
Quantity One Version 4.5.2	

Bradford

Verbrauchsmaterial, Geräte, Reagenzien	Bezugsquelle
Photometer Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare, Deutschland
Bradfordreagenz, 450ml	Bio-Rad Laboratories, UK
Bradford Standard, 20ml	Bio-Rad Laboratories, UK
Aqua dest.	Apothekenbedarf der LMU München - Deutschland

Sonstiges

SPSS	Windows, Social Sciences computer software version 14.0; SPSS Inc., USA
------	--

8 Literaturverzeichnis

- Adams, L., G. K. Scott, et al. (1996). "Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1." *Biochim Biophys Acta* 1312(2): 137-44.
- Ahmad, N., H. J. Gabius, et al. (2004). "Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3." *Glycobiology* 14(9): 817-25.
- Ahmed, H., J. Pohl, et al. (1996). "The primary structure and carbohydrate specificity of a beta-galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*." *J Biol Chem* 271(51): 33083-94.
- Airaksinen, M. S., A. Titievsky, et al. (1999). "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?" *Mol Cell Neurosci* 13(5): 313-25.
- Al-Nasiry, S., B. Spitz, et al. (2006). "Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells." *Hum Reprod* 21(1): 193-201.
- Amano, M., M. Galvan, et al. (2003). "The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death." *J Biol Chem* 278(9): 7469-75.
- Andersen, H., O. N. Jensen, et al. (2003). "A proteome study of secreted prostatic factors affecting osteoblastic activity: galectin-1 is involved in differentiation of human bone marrow stromal cells." *J Bone Miner Res* 18(2): 195-203.
- Aspillaga, M. O., P. G. Whittaker, et al. (1983). "Endocrinologic events in early pregnancy failure." *Am J Obstet Gynecol* 147(8): 903-8.
- Avril, T., A. C. Jarrousseau, et al. (1999). "Trophoblast cell line resistance to NK lysis mainly involves an HLA class I-independent mechanism." *J Immunol* 162(10): 5902-9.
- Barondes, S. H., V. Castronovo, et al. (1994). "Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins." *Cell* 76(4): 597-8.
- Barr, N., C. R. Taylor, et al. (1989). "Are pancarcinoma T and Tn differentiation antigens?" *Cancer* 64(4): 834-41.
- Baum, L. G., D. P. Blackall, et al. (2003). "Amelioration of graft versus host disease by galectin-1." *Clin Immunol* 109(3): 295-307.
- Baum, L. G., M. Pang, et al. (1995). "Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells." *J Exp Med* 181(3): 877-87.
- Beaudoin, C., M. Bonenfant, et al. (1997). "Regulation of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase type 1 and estradiol-17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA levels by calcium in human choriocarcinoma JEG-3 cells." *Mol Cell Endocrinol* 133(1): 63-71.
- Berberat, P. O., H. Friess, et al. (2001). "Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer." *J Histochem Cytochem* 49(4): 539-49.
- Berner, F., A. Sarasin, et al. (1999). "Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11329-34.

- Blaser, C., M. Kaufmann, et al. (1998). "Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells." *Eur J Immunol* 28(8): 2311-9.
- Blois, S. M., J. M. Ibarregui, et al. (2007). "A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance." *Nat Med* 13(12): 1450-7.
- Boyd, W. C. and E. Shapleigh (1954). "Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins." *J Immunol* 73(4): 226-31.
- Brown, T. J., W. W. Shuford, et al. (1996). "Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells." *J Biol Chem* 271(44): 27686-95.
- Byth, K. F., L. A. Conroy, et al. (1996). "CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation." *J Exp Med* 183(4): 1707-18.
- Cao, Y., P. Stosiek, et al. (1996). "Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study." *Histochem Cell Biol* 106(2): 197-207.
- Chiariello, M., R. Visconti, et al. (1998). "Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH2-terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret." *Oncogene* 16(19): 2435-45.
- Chiariotti, L., M. T. Berlingieri, et al. (1995). "Expression of galectin-1 in normal human thyroid gland and in differentiated and poorly differentiated thyroid tumors." *Int J Cancer* 64(3): 171-5.
- Cho, M. and R. D. Cummings (1995). "Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis." *J Biol Chem* 270(10): 5207-12.
- Clark, G. F., A. Dell, et al. (2001). "The species recognition system: a new corollary for the human foetoembryonic defense system hypothesis." *Cells Tissues Organs* 168(1-2): 113-21.
- Cooper, D. N. and S. H. Barondes (1990). "Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism." *J Cell Biol* 110(5): 1681-91.
- Cooper, D. N. and S. H. Barondes (1999). "God must love galectins; he made so many of them." *Glycobiology* 9(10): 979-84.
- Couraud, P. O., D. Casentini-Borocz, et al. (1989). "Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin." *J Biol Chem* 264(2): 1310-6.
- Coutifaris, C., L. C. Kao, et al. (1991). "E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts." *Development* 113(3): 767-77.
- Crocker, I. P., D. M. Tansinda, et al. (2004). "Altered cell kinetics in cultured placental villous explants in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction." *J Pathol* 204(1): 11-8.
- Daoud, G., M. Amyot, et al. (2005). "ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta." *J Physiol* 566(Pt 2): 409-23.
- Daoud, G., E. Rassart, et al. (2006). "Src family kinases play multiple roles in differentiation of trophoblasts from human term placenta." *J Physiol* 571(Pt 3): 537-53.
- Dettin, L., N. Rubinstein, et al. (2003). "Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis." *Biol Reprod* 68(1): 51-9.

- Di Lella, S., M. A. Marti, et al. "Linking the Structure and Thermal Stability of beta-Galactoside-Binding Protein Galectin-1 to Ligand Binding and Dimerization Equilibria." Biochemistry.
- Ding, Y. M., J. H. Dong, et al. (2009). "Increased expression of galectin-1 is associated with human oral squamous cell carcinoma development." Oncol Rep 21(4): 983-7.
- Dunphy, J. L., G. J. Barcham, et al. (2002). "Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge." J Biol Chem 277(17): 14916-24.
- Elad-Sfadia, G., R. Haklai, et al. (2002). "Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase." J Biol Chem 277(40): 37169-75.
- Endharti, A. T., Y. W. Zhou, et al. (2005). "Galectin-1 supports survival of naive T cells without promoting cell proliferation." Eur J Immunol 35(1): 86-97.
- Fajka-Boja, R., M. Szemes, et al. (2002). "Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines." Immunol Lett 82(1-2): 149-54.
- Fischer, C., H. Sanchez-Ruderisch, et al. (2005). "Galectin-1 interacts with the $\{\alpha\}5\{\beta\}1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27." J Biol Chem 280(44): 37266-77.
- Fischer, I., S. Redel, et al. "Stimulation of Syncytium Formation in vitro in Human Trophoblast Cells by Galectin-1." Placenta.
- Fischer, I., S. Schulze, et al. (2009). "Inhibition of RET and JAK2 signals and upregulation of VEGFR3 phosphorylation in vitro by galectin-1 in trophoblast tumor cells BeWo." Placenta 30(12): 1078-82.
- Fitzgerald, J. S., S. Busch, et al. (2005). "Signal transduction in trophoblast invasion." Chem Immunol Allergy 88: 181-99.
- Fitzgerald, J. S., T. G. Poehlmann, et al. (2008). "Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)." Hum Reprod Update 14(4): 335-44.
- Frendo, J. L., L. Cronier, et al. (2003). "Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation." J Cell Sci 116(Pt 16): 3413-21.
- Fuertes, M. B., L. L. Molinero, et al. (2004). "Regulated expression of galectin-1 during T-cell activation involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase and p70S6 kinase." Mol Cell Biochem 267(1-2): 177-85.
- Fukuda, T., K. Kiuchi, et al. (2002). "Novel mechanism of regulation of Rac activity and lamellipodia formation by RET tyrosine kinase." J Biol Chem 277(21): 19114-21.
- Fulcher, J. A., M. H. Chang, et al. (2009). "Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling." J Biol Chem 284(39): 26860-70.
- Gabius, H. J. (2001). "Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins." Anat Histol Embryol 30(1): 3-31.
- Gabius, H. J., H. C. Siebert, et al. (2004). "Chemical biology of the sugar code." Chembiochem 5(6): 740-64.
- Galvan, M., S. Tsuboi, et al. (2000). "Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1." J Biol Chem 275(22): 16730-7.
- Garin, M. I., C. C. Chu, et al. (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." Blood 109(5): 2058-65.

- Garner, O. B., H. C. Aguilar, et al. "Endothelial galectin-1 binds to specific glycans on nipah virus fusion protein and inhibits maturation, mobility, and function to block syncytia formation." *PLoS Pathog* 6(7): e1000993.
- Georgiadis, V., H. J. Stewart, et al. (2007). "Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration." *Dev Dyn* 236(4): 1014-24.
- Getsios, S., G. T. Chen, et al. (2000). "Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression." *J Reprod Fertil* 119(1): 59-68.
- Getsios, S. and C. D. MacCalman (2003). "Cadherin-11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro." *Dev Biol* 257(1): 41-54.
- Grummer, R., H. P. Hohn, et al. (1994). "Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system." *Placenta* 15(4): 411-29.
- Gu, M., W. Wang, et al. (1994). "Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation." *J Cell Sci* 107 (Pt 1): 175-81.
- Hahn, H. P., M. Pang, et al. (2004). "Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death." *Cell Death Differ* 11(12): 1277-86.
- Hamlin, G. P. and M. J. Soares (1995). "Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in proliferating and differentiating trophoblast cells: involvement of transferrin, transforming growth factor-beta, and tyrosine kinases." *Endocrinology* 136(1): 322-31.
- Hammer, A., A. Blaschitz, et al. (1999). "Fas and Fas-ligand are expressed in the uteroplacental unit of first-trimester pregnancy." *Am J Reprod Immunol* 41(1): 41-51.
- Harrison, F. L. and T. J. Wilson (1992). "The 14 kDa beta-galactoside binding lectin in myoblast and myotube cultures: localization by confocal microscopy." *J Cell Sci* 101 (Pt 3): 635-46.
- Hayashi, H., M. Ichihara, et al. (2000). "Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor." *Oncogene* 19(39): 4469-75.
- He, J. and L. G. Baum (2004). "Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death." *J Biol Chem* 279(6): 4705-12.
- Hernandez, J. D., J. T. Nguyen, et al. (2006). "Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death." *J Immunol* 177(8): 5328-36.
- Hinck, L., I. S. Nathke, et al. (1994). "Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly." *J Cell Biol* 125(6): 1327-40.
- Hirabayashi, J. and K. Kasai (1993). "The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution." *Glycobiology* 3(4): 297-304.
- Hittelet, A., H. Legendre, et al. (2003). "Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration." *Int J Cancer* 103(3): 370-9.
- Hsu, D. K. and F. T. Liu (2004). "Regulation of cellular homeostasis by galectins." *Glycoconj J* 19(7-9): 507-15.
- Hughes, R. C. (1999). "Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins." *Biochim Biophys Acta* 1473(1): 172-85.

- Hughes, R. C. (2001). "Galectins as modulators of cell adhesion." *Biochimie* 83(7): 667-76.
- Hunter, T. (1998). "The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353(1368): 583-605.
- Iurisci, I., N. Tinari, et al. (2000). "Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients." *Clin Cancer Res* 6(4): 1389-93.
- Jameson, J. L. and A. N. Hollenberg (1993). "Regulation of chorionic gonadotropin gene expression." *Endocr Rev* 14(2): 203-21.
- Jeschke, U., U. Karsten, et al. (2006). "Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody." *Histochem Cell Biol* 126(4): 437-44.
- Jeschke, U., D. Mayr, et al. (2007). "Expression of galectin-1, -3 (gal-1, gal-3) and the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in normal, IUGR, preeclamptic and HELLP placentas." *Placenta* 28(11-12): 1165-73.
- Jeschke, U., T. Reimer, et al. (2004). "Binding of galectin-1 (gal-1) on trophoblast cells and inhibition of hormone production of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1." *Histochem Cell Biol* 121(6): 501-8.
- Jeschke, U., D. U. Richter, et al. (2002). "Expression of the Thomsen-Friedenreich antigen and of its putative carrier protein mucin 1 in the human placenta and in trophoblast cells in vitro." *Histochem Cell Biol* 117(3): 219-26.
- Jhiang, S. M. (2000). "The RET proto-oncogene in human cancers." *Oncogene* 19(49): 5590-7.
- Joubert, R., S. Kuchler, et al. (1989). "Immunohistochemical localization of a beta-galactoside-binding lectin in rat central nervous system. I. Light- and electron-microscopical studies on developing cerebral cortex and corpus callosum." *Dev Neurosci* 11(6): 397-413.
- Jung, E. J., H. G. Moon, et al. (2007). "Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer." *Int J Cancer* 120(11): 2331-8.
- King, A., L. Thomas, et al. (2000). "Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report." *Placenta* 21 Suppl A: S113-9.
- Kirkham, B. W., F. Thien, et al. (1992). "Chimeric CD7 monoclonal antibody therapy in rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 19(9): 1348-52.
- Kita, N., J. Mitsushita, et al. (2003). "Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts." *Placenta* 24(2-3): 164-72.
- Klaus, S. J., S. P. Sidorenko, et al. (1996). "CD45 ligation induces programmed cell death in T and B lymphocytes." *J Immunol* 156(8): 2743-53.
- Kohrenhagen, N., H. U. Voelker, et al. "The expression of galectin-1 in vulvar neoplasia." *Anticancer Res* 30(5): 1547-52.
- Kopcow, H. D., F. Rosetti, et al. (2008). "T cell apoptosis at the maternal-fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(47): 18472-7.
- Kopitz, J., C. von Reitzenstein, et al. (2001). "Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3." *J Biol Chem* 276(38): 35917-23.
- Kovacs-Solyom, F., A. Blasko, et al. "Mechanism of tumor cell-induced T-cell apoptosis mediated by galectin-1." *Immunol Lett* 127(2): 108-18.

- Kurenova, E. V., D. L. Hunt, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor receptor-3 promotes breast cancer cell proliferation, motility and survival in vitro and tumor formation in vivo." *Cell Cycle* 8(14): 2266-80.
- Kuwabara, I. and F. T. Liu (1996). "Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin." *J Immunol* 156(10): 3939-44.
- Langbein, S., J. Brade, et al. (2007). "Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance." *Histopathology* 51(5): 681-90.
- Lange, F., B. Brandt, et al. (2009). "Galectin-1 induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway: evidence for a connection between death-receptor and mitochondrial pathways in human Jurkat T lymphocytes." *Histochem Cell Biol* 132(2): 211-23.
- Le, Q. T., G. Shi, et al. (2005). "Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege." *J Clin Oncol* 23(35): 8932-41.
- Leffler, H., S. Carlsson, et al. (2004). "Introduction to galectins." *Glycoconj J* 19(7-9): 433-40.
- Leppanen, A., S. Stowell, et al. (2005). "Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetylglucosamine units on surface-bound extended glycans." *J Biol Chem* 280(7): 5549-62.
- Lesage, S., A. M. Steff, et al. (1997). "CD4+ CD8+ thymocytes are preferentially induced to die following CD45 cross-linking, through a novel apoptotic pathway." *J Immunol* 159(10): 4762-71.
- Lewis, S. K., J. L. Farmer, et al. (2007). "Galectin 15 (LGALS15): a gene uniquely expressed in the uteri of sheep and goats that functions in trophoblast attachment." *Biol Reprod* 77(6): 1027-36.
- Lin, H., T. R. Mosmann, et al. (1993). "Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface." *J Immunol* 151(9): 4562-73.
- Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, et al. (1989). "Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER." *Cell* 56(5): 801-13.
- Lis, H. and N. Sharon (1998). "Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition." *Chem Rev* 98(2): 637-674.
- Lobsanov, Y. D., M. A. Gitt, et al. (1993). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the human dimeric S-Lac lectin (L-14-II)." *J Mol Biol* 233(3): 553-5.
- Lopez-Lucendo, M. F., D. Solis, et al. (2004). "Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding." *J Mol Biol* 343(4): 957-70.
- Maeda, N., N. Kawada, et al. (2003). "Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways." *J Biol Chem* 278(21): 18938-44.
- Malassine, A. and L. Cronier (2002). "Hormones and human trophoblast differentiation: a review." *Endocrine* 19(1): 3-11.
- Malassine, A., K. Handschuh, et al. (2005). "Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta." *Placenta* 26(7): 556-62.
- Marsich, E., P. Mozetic, et al. (2008). "Galectin-1 in cartilage: Expression, influence on chondrocyte growth and interaction with ECM components." *Matrix Biol* 27(6): 513-25.

- Masuzaki, H., Y. Ogawa, et al. (1997). "Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans." *Nat Med* 3(9): 1029-33.
- Matarrese, P., A. Tinari, et al. (2005). "Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission." *J Biol Chem* 280(8): 6969-85.
- Matsumoto, R., H. Matsumoto, et al. (1998). "Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel eosinophil chemoattractant produced by T lymphocytes." *J Biol Chem* 273(27): 16976-84.
- Misumi, Y., K. Miki, et al. (1986). "Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes." *J Biol Chem* 261(24): 11398-403.
- Moiseeva, E. P., Q. Javed, et al. (2000). "Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation." *Cardiovasc Res* 45(2): 493-502.
- Moiseeva, E. P., E. L. Spring, et al. (1999). "Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix." *J Vasc Res* 36(1): 47-58.
- Moiseeva, E. P., B. Williams, et al. (2003). "Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin." *Biochem Biophys Res Commun* 310(3): 1010-6.
- Morel, Y., F. Mebarki, et al. (1997). "Structure-function relationships of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: contribution made by the molecular genetics of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency." *Steroids* 62(1): 176-84.
- Morris, S., N. Ahmad, et al. (2004). "Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7." *Glycobiology* 14(3): 293-300.
- Nguyen, J. T., D. P. Evans, et al. (2001). "CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans." *J Immunol* 167(10): 5697-707.
- Nickel, W. (2003). "The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes." *Eur J Biochem* 270(10): 2109-19.
- Nickel, W. (2005). "Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells." *Traffic* 6(8): 607-14.
- Offner, H., B. Celnik, et al. (1990). "Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 28(2): 177-84.
- Ozawa, M., H. Baribault, et al. (1989). "The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species." *EMBO J* 8(6): 1711-7.
- Pace, K. E., H. P. Hahn, et al. (2000). "CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1-induced T cell death." *J Immunol* 165(5): 2331-4.
- Pace, K. E., C. Lee, et al. (1999). "Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1." *J Immunol* 163(7): 3801-11.
- Pattillo, R. A. and G. O. Gey (1968). "The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro." *Cancer Res* 28(7): 1231-6.
- Paz, A., R. Haklai, et al. (2001). "Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation." *Oncogene* 20(51): 7486-93.
- Perillo, N. L., K. E. Pace, et al. (1995). "Apoptosis of T cells mediated by galectin-1." *Nature* 378(6558): 736-9.
- Perillo, N. L., C. H. Uittenbogaart, et al. (1997). "Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes." *J Exp Med* 185(10): 1851-8.

- Perone, M. J., S. Bertera, et al. (2009). "Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1." *J Immunol* 182(5): 2641-53.
- Perone, M. J., S. Bertera, et al. (2006). "Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice." *J Immunol* 177(8): 5278-89.
- Plaza Menacho, I., R. Koster, et al. (2005). "RET-familial medullary thyroid carcinoma mutants Y791F and S891A activate a Src/JAK/STAT3 pathway, independent of glial cell line-derived neurotrophic factor." *Cancer Res* 65(5): 1729-37.
- Poirier, F., P. M. Timmons, et al. (1992). "Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development." *Development* 115(1): 143-55.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." *Genes Dev* 14(15): 1837-51.
- Proll, J., A. Blaschitz, et al. (1999). "First trimester human endovascular trophoblast cells express both HLA-C and HLA-G." *Am J Reprod Immunol* 42(1): 30-6.
- Rabinovich, G., L. Castagna, et al. (1996). "Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages." *J Leukoc Biol* 59(3): 363-70.
- Rabinovich, G. A. (1999). "Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy." *Cell Death Differ* 6(8): 711-21.
- Rabinovich, G. A., A. Ariel, et al. (1999). "Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1." *Immunology* 97(1): 100-6.
- Rabinovich, G. A., G. Daly, et al. (1999). "Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis." *J Exp Med* 190(3): 385-98.
- Rabinovich, G. A. and J. M. Illarregui (2009). "Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments." *Immunol Rev* 230(1): 144-59.
- Rabinovich, G. A., R. E. Ramhorst, et al. (2002). "Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms." *Cell Death Differ* 9(6): 661-70.
- Rabinovich, G. A., C. E. Sotomayor, et al. (2000). "Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation." *Eur J Immunol* 30(5): 1331-9.
- Rao, S. P., Z. Wang, et al. (2007). "Galectin-3 functions as an adhesion molecule to support eosinophil rolling and adhesion under conditions of flow." *J Immunol* 179(11): 7800-7.
- Remmele, W. and H. Stegner (1987). "Vorschlag zur einheitlichen Definierung eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe." *Pathologe* 8: 138-140.
- Richter, D. U., U. Jeschke, et al. (2000). "Expression of the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen in the human placenta." *Anticancer Res* 20(6D): 5129-33.
- Ringler, G. E. and J. F. Strauss, 3rd (1990). "In vitro systems for the study of human placental endocrine function." *Endocr Rev* 11(1): 105-23.
- Rorive, S., N. Belot, et al. (2001). "Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma." *Glia* 33(3): 241-55.
- Rubinstein, N., M. Alvarez, et al. (2004). "Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege." *Cancer Cell* 5(3): 241-51.

- Sacchettini, J. C., L. G. Baum, et al. (2001). "Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction." *Biochemistry* 40(10): 3009-15.
- Sakaguchi, M., T. Shingo, et al. (2006). "A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7112-7.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* 155(3): 1151-64.
- Santucci, L., S. Fiorucci, et al. (2000). "Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice." *Hepatology* 31(2): 399-406.
- Santucci, L., S. Fiorucci, et al. (2003). "Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice." *Gastroenterology* 124(5): 1381-94.
- Sasaki, Y., M. Sakai, et al. (2004). "Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases." *Mol Hum Reprod* 10(5): 347-53.
- Schiessl, B., B. A. Innes, et al. (2009). "Localization of angiogenic growth factors and their receptors in the human placental bed throughout normal human pregnancy." *Placenta* 30(1): 79-87.
- Schuchardt, A., V. D'Agati, et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." *Nature* 367(6461): 380-3.
- Schuringa, J. J., K. Wojtachnio, et al. (2001). "MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3." *Oncogene* 20(38): 5350-8.
- Schwarz, F. P., H. Ahmed, et al. (1998). "Thermodynamics of bovine spleen galectin-1 binding to disaccharides: correlation with structure and its effect on oligomerization at the denaturation temperature." *Biochemistry* 37(17): 5867-77.
- Seddon, B. and D. Mason (1999). "Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC-cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes." *J Exp Med* 189(2): 279-88.
- Seelenmeyer, C., C. Stegmayer, et al. (2008). "Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 and galectin-1 does not require shedding of plasma membrane-derived vesicles." *FEBS Lett* 582(9): 1362-8.
- Sempowski, G. D., D. M. Lee, et al. (1999). "Structure and function of the CD7 molecule." *Crit Rev Immunol* 19(4): 331-48.
- Sgroi, D., A. Nocks, et al. (1996). "A single N-linked glycosylation site is implicated in the regulation of ligand recognition by the I-type lectins CD22 and CD33." *J Biol Chem* 271(31): 18803-9.
- Shevach, E. M. (2000). "Regulatory T cells in autoimmunity*." *Annu Rev Immunol* 18: 423-49.
- Shibuya, M. and L. Claesson-Welsh (2006). "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." *Exp Cell Res* 312(5): 549-60.
- Shimonishi, T., K. Miyazaki, et al. (2001). "Expression of endogenous galectin-1 and galectin-3 in intrahepatic cholangiocarcinoma." *Hum Pathol* 32(3): 302-10.
- Springer, G. F. (1984). "T and Tn, general carcinoma autoantigens." *Science* 224(4654): 1198-206.

- Srisuparp, S., Z. Strakova, et al. (2001). "The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation." Arch Med Res 32(6): 627-34.
- Strauss, J. F., 3rd, F. Martinez, et al. (1996). "Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions." Biol Reprod 54(2): 303-11.
- Sturm, A., M. Lensch, et al. (2004). "Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation." J Immunol 173(6): 3825-37.
- Sugden, P. H. and A. Clerk (1997). "Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors." Cell Signal 9(5): 337-51.
- Sullivan, M. H. (2004). "Endocrine cell lines from the placenta." Mol Cell Endocrinol 228(1-2): 103-19.
- Suri-Payer, E. and H. Cantor (2001). "Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells." J Autoimmun 16(2): 115-23.
- Symons, A., D. N. Cooper, et al. (2000). "Characterization of the interaction between galectin-1 and lymphocyte glycoproteins CD45 and Thy-1." Glycobiology 10(6): 559-63.
- Takahashi, M., Y. Buma, et al. (1988). "Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains." Oncogene 3(5): 571-8.
- Teichberg, V. I., I. Silman, et al. (1975). "A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*." Proc Natl Acad Sci U S A 72(4): 1383-7.
- Thijssen, V. L., B. Barkan, et al. "Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity." Cancer Res 70(15): 6216-24.
- Thijssen, V. L., S. Hulsmans, et al. (2008). "The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells." Am J Pathol 172(2): 545-53.
- Thijssen, V. L., R. Postel, et al. (2006). "Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy." Proc Natl Acad Sci U S A 103(43): 15975-80.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med 188(2): 287-96.
- Toscano, M. A., A. G. Commodaro, et al. (2006). "Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses." J Immunol 176(10): 6323-32.
- van den Brule, F., S. Califice, et al. (2003). "Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin." Lab Invest 83(3): 377-86.
- van den Brule, F. A., D. Waltregny, et al. (2001). "Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients." J Pathol 193(1): 80-7.
- Vargas, A., J. Moreau, et al. (2008). "Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor." Placenta 29(2): 170-4.
- Vicovac, L., M. Jankovic, et al. (1998). "Galectin-1 and -3 in cells of the first trimester placental bed." Hum Reprod 13(3): 730-5.
- von Wolff, M., X. Wang, et al. (2005). "Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation." Mol Hum Reprod 11(3): 189-94.

- Wada, J. and Y. S. Kanwar (1997). "Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin." *J Biol Chem* 272(9): 6078-86.
- Wagner-Hulsmann, C., N. Bachinski, et al. (1996). "A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system." *Glycobiology* 6(8): 785-93.
- Walzel, H., M. Blach, et al. (2000). "Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells." *Glycobiology* 10(2): 131-40.
- Walzel, H., P. Neels, et al. (1995). "Immunohistochemical and glycohistochemical localization of the beta-galactoside-binding S-type lectin in human placenta." *Acta Histochem* 97(1): 33-42.
- White, D. E., N. A. Kurpios, et al. (2004). "Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction." *Cancer Cell* 6(2): 159-70.
- Wice, B., D. Menton, et al. (1990). "Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro." *Exp Cell Res* 186(2): 306-16.
- Wiest, I., C. Seliger, et al. (2005). "Induction of apoptosis in human breast cancer and trophoblast tumor cells by galectin-1." *Anticancer Res* 25(3A): 1575-80.
- Wilson, T. J., M. N. Firth, et al. (1989). "The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes." *Biochem J* 261(3): 847-52.
- Wu, M. H., T. M. Hong, et al. (2009). "Galectin-1-Mediated Tumor Invasion and Metastasis, Up-Regulated Matrix Metalloproteinase Expression, and Reorganized Actin Cytoskeletons." *Mol Cancer Res*.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, et al. (1996). "Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6737-42.
- Yang, R. Y., D. K. Hsu, et al. (2001). "Cell cycle regulation by galectin-12, a new member of the galectin superfamily." *J Biol Chem* 276(23): 20252-60.
- Yoshii, T., T. Fukumori, et al. (2002). "Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest." *J Biol Chem* 277(9): 6852-7.
- Yun, Z. and A. J. Giaccia (2003). "Tumor deprivation of oxygen and tumor suppressor gene function." *Methods Mol Biol* 223: 485-504.
- Zabaglo, L., M. G. Ormerod, et al. (2003). "Measurement of proliferation marker Ki67 in breast tumour FNAs using laser scanning cytometry in comparison to conventional immunocytochemistry." *Cytometry B Clin Cytom* 56(1): 55-61.
- Zuniga, E., A. Gruppi, et al. (2001). "Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival." *Infect Immun* 69(11): 6804-12.
- Zuniga, E., G. A. Rabinovich, et al. (2001). "Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis." *J Leukoc Biol* 70(1): 73-9.

9 Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München. Teile der Arbeit wurden veröffentlicht (*Fischer, Redel et al. ; Fischer, Schulze et al. 2009*).

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Jeschke für die Vergabe des Themas und die vorzügliche Förderung der Arbeit.

Auch bedanke ich mich bei den technischen Assistentinnen Christina Kuhn, Simone Hoffmann, Sandra Schulze und Susanne Kunze, ohne deren Einarbeitung und Unterstützung die Laborarbeit in diesem Umfang nicht entstanden wäre.

Ich danke auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jeschke für die stets gute und freundliche Zusammenarbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums sowohl finanziell als auch seelisch über jedes erdenkliche Maß unterstützt hat.

10 Widmung

Meinen Eltern

11 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Isabelle Jeanine Fischer
 geb.: 09.09.1985 in Genf
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

AUSBILDUNG

10/2003 – 06/2010 Studium der Medizin, LMU München
 06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut),
 Approbation als Ärztin
 08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2003 Abitur
 09/1994 – 07/2003 Europäische Schule München
 09/1989 – 08/1994 Deutsch-Französische Schule, Lycée Jean Renoir, München

PROMOTION

„Einfluss von Galectin-1 auf die Syncytiumbildung, Proliferation und die Signalwegauswahl in Trophoblasttumorzellen BeWo“ Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, LMU München, Prof. U. Jeschke

PUBLIKATIONEN, POSTERPRÄSENTATIONEN UND VORTRÄGE

Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Frieze K, Walzel H, Jeschke U: Influence of galectin-1 on syncytium formation, proliferation and signal processes in trophoblast tumor cells BeWo (Vortrag 8th European Congress on Reproductive Immunology, München, 13.11.2010)

Fischer I, Jeschke U, Frieze K, Daher S, Betz A: The role of galectin-1 in trophoblast differentiation and signal transduction (Journal of reproductive Immunology, 04/2011)

Fischer I, Weber M, Kuhn C, Kuhn C, Fitzgerald J, Schulze S, Frieze K, Walzel H, Markert U, Jeschke U: Is galectin-1 a trigger for trophoblast cell fusion?: the MAP-Kinase pathway and syncytium formation in trophoblast tumor cells BeWo (Molecular human reproduction 08/2010)

Fischer I, Redel S, Hofmann S, Kuhn C, Frieze K, Walzel H, Jeschke U: Stimulation of syncytium formation in vitro in human trophoblast cells by galectin-1 (Placenta, 07/2010)

Fischer I, Schulze S, Kuhn C, Frieze K, Walzel H, Markert U.R, Jeschke U, Inhibition of RET and JAK2 signals and upregulation of VEGFR3 phosphorylation in vitro by galectin-1 in trophoblast tumour cells BeWo (Placenta 12/2009)

Fischer I, Walzel H, Kuhn C, Schulze S, Frieze K, Jeschke U: Induction of syncytium formation in trophoblast tumor cells BeWo by gal-1 (Vortrag bei 3rd EMBIC Summer School, Jena, 03.-07.09.2007)

Fischer I, Jeschke U, Kuhn C, Schulze S, Frieze K: Untersuchungen zum Einfluss von Gal-1 auf die Synzytium-Bildung und Steroid Hormon Synthese in Trophoblastzellen (Vortrag an der Gemeinsamen Tagung der Bayerischen Gesellschaft für Geburtshilfe und Frauenheilkunde e.V. und der Österreichischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, München 07.-09.06.2007)

Jeschke U, Fischer I, Kuhn C, Frieze K: The role of galectin-1 in syncytium formation and signal transduction in trophoblast tumor cells bewo (Onkologie)